

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Věra Lamborová

Epigenetická regulace genů HLA II. třídy a její modifikace během života

Epigenetic regulation of HLA class II genes and its modification during the lifetime

Diplomová práce

Školitel: Ing. Anna Kotrbová – Kozak, Ph.D.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15.8.2013

Poděkování

Ráda bych poděkovala doc. MUDr. Marii Černé, Csc. za umožnění práce na velmi zajímavém projektu a také své školitelce Ing. Anně Kotrbové – Kozak, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady během tvorby této diplomové práce.

Děkuji také Ing. Martě Zajacové a ostatním kolegům z laboratoře za rady, pomoc a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Poděkování patří i mé rodině, která mě během studií podporovala.

Abstrakt

Úvod: Molekuly hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) hrají důležitou úlohu v regulaci imunitní odpovědi a udržování imunitní homeostázy. Regulace jejich exprese je proto klíčovým faktorem ovlivňujícím adaptivní imunitní odpověď. Jedním z mechanismů této regulace je methylace DNA v promotorových oblastech, která ovlivňuje dostupnost DNA pro transkripční faktory. Stárnutí organismu je spojeno se změnami v methylaci DNA a zvýšená predispozice k rozvoji autoimunitních onemocnění ve stáří by proto mohla být spojena právě se změnami v methylačním stavu regulačních oblastí genů MHC II. třídy.

Cíle: Cílem této práce je analýza methylačního stavu regulačních oblastí genů *DQA1* a *DQB1* a porovnání rozdílů mezi generacemi a jednotlivými alelami. Dále je porovnána úroveň exprese mRNA genu *DQA1* mezi generacemi a mezi jednotlivými alelami.

Metody: Z krve odebrané dárčům ze tří různých věkových skupin byly izolovány DNA a RNA. DNA byla modifikována bisulfitovou konverzí, dále byly amplifikovány regulační oblasti genů *DQA1* a *DQB1* a tyto úseky byly klonovány do bakterií. Pozitivní klony byly sekvenovány a podrobeny methylační analýze. RNA byla pomocí reverzní transkripce přepsána do cDNA a relativní úroveň její exprese byla poté určena pomocí kvantitativní PCR.

Výsledky: Statisticky významný rozdíl v mezigeneračním porovnání promotorové oblasti genu *DQA1* byl nalezen v pozicích -562 a -540 nukleotidů od počátku transkripce. V těchto místech byla QAP alela 1.1 vzorků pocházejících od studentů methylována více než u vzorků seniorů. Při porovnání methylačního stavu jednotlivých QAP alel ve skupině studentů bylo nalezeno několik statisticky významných rozdílů. Alely QAP 1.3 a QAP 4.1A byly methylovány v menší míře než ostatní alely. Podobné závěry se podařilo prokázat také pro alelu QAP 1.3 porovnáním jednotlivých QAP alel ve věkové skupině seniorů. U dětí se podobné závěry podařit neprokázalo, což může být způsobeno nedostatečným počtem analyzovaných sekvencí. Analýzou rozdílu methylačního stavu jednotlivých CpG míst v regulační oblasti mezi jednotlivými alelami *DQB1* dětí byl prokázán statisticky významný rozdíl v místě 2235 nukleotidů od počátku transkripce, ve které byla alela *DQB1*0602* methylována v menší míře než alela *DQB1*0501*.

Klíčová slova: HLA II. třídy, HLA *DQA1*, HLA *DQB1*, epigenetika, methylace DNA, stárnutí

Abstract

Background: The major histocompatibility complex (MHC) molecules play an important role in the immune response regulation and in the maintenance of the immune homeostasis. Regulation of their expression is therefore a key factor influencing the adaptive immune response. DNA methylation of gene regulatory regions is one of the mechanisms of gene expression control that affects the accessibility of DNA to transcription factors. Ageing is connected with changes in DNA methylation and increased predisposition to autoimmune diseases in older age could be associated with changes in MHC class II genes methylation.

Aims: The aim of this diploma thesis is to analyze the methylation profile of *DQA1* and *DQB1* genes regulatory regions and to compare its differences between the generations and between individual alleles. The next aim is to compare *DQA1* mRNA expression between the generations and between single alleles.

Methods: DNA and RNA were isolated from blood of three age group donors. DNA was converted by the bisulfite treatment and regulatory regions of HLA class II genes were amplified and cloned into bacteria. Positive clones were sequenced and then analyzed. RNA was reverse transcribed and its expression level was determined by real-time PCR.

Results: Statistically significant differences were found by intergenerational comparison of promoter region methylation of *DQA1* gene alleles. QAP allele 1.1 was methylated more in students than in generation of seniors at positions -562 and -540 from the transcription start. Other significant difference was found by comparison of individual alleles within the students group, where QAP alleles 1.3 and 4.1A were less methylated than the other alleles. The same outcome was found for QAP allele 1.3 in seniors group. The reason why similar results were not found in the group of children may be the small number of samples. Statistically significant difference was also found by analysis of regulatory region of the *DQB1* gene. Allele *DQB1**0602 was methylated less than allele *DQB1**0501 at position 2235 nucleotides from the transcription start.

Key words: HLA class II, HLA *DQA1*, HLA *DQB1*, epigenetics, DNA methylation, ageing

Obsah

SEZNAM ZKRATEK	8
1. ÚVOD	9
2. PŘEHLED LITERATURY.....	10
2.1 Epigenetika.....	10
2.1.1 Methylace DNA	10
2.1.1.1 Výskyt methylace DNA	10
2.1.1.2 Mechanismus methylace DNA.....	11
2.1.1.3 DNA methyltransferázy.....	12
2.1.1.4 Efekty methylace DNA	14
2.1.2 Funkce histonů v epigenetické regulaci	15
2.1.2.1 Struktura chromatinu	15
2.1.2.2 Posttranslační úpravy histonů.....	16
2.1.2.3 Propojení methylace DNA a posttranslačních úprav histonů.....	18
2.1.3 Modifikace epigenetické regulace v průběhu života.....	18
2.1.3.1 Epigenetická regulace během embryonálního vývoje.....	18
2.1.3.2 Epigenetické mutace.....	20
2.1.3.3 Vliv prostředí.....	20
2.1.3.4 Změny epigenetické regulace spojené se stárnutím organismu	21
2.1.3.5 Vliv epigenetické regulace na délku života.....	23
2.2 Glykoproteiny hlavního histokompatibilního komplexu	23
2.2.1 Struktura molekuly MHC II. třídy	24
2.2.2 HLA genový komplex.....	25
2.2.3 Regulace transkripce MHC II. třídy.....	26
2.2.4 Exprese alel MHC II. třídy.....	27
2.2.5 Transkripční regulátory	27
3. CÍLE PRÁCE	30
4. MATERIÁL A METODY	31
4.1 Použitý materiál	31
4.2 Techniky a metodické postupy.....	34
4.2.1 Subjekt studie	34
4.2.2 Metody zpracování DNA	35
4.2.2.1 Izolace DNA	35
4.2.2.2 Stanovení koncentrace a čistoty DNA.....	36
4.2.2.3 Agarózová elektroforéza v TBE pufru	36
4.2.2.4 Genotypizace HLA molekul.....	36
4.2.2.5 Bisulfitová konverze DNA	37
4.2.2.6 Amplifikace produktu pomocí nested PCR.....	39
4.2.2.7 Izolace a přečištění PCR produktu	40
4.2.2.8 Klonování	41

4.2.2.9	Sekvenace	44
4.2.3	Metody zpracování RNA	44
4.2.3.1	Izolace RNA	45
4.2.3.2	Reverzní transkripce	46
4.2.3.3	Kvantitativní PCR	46
4.2.4	Statistická analýza	48
5.	VÝSLEDKY	49
5.1	Genotypizace HLA molekul	49
5.2	Analýza methylačního stavu promotoru genu <i>DQA1</i>	50
5.2.1	Určení alel promotoru genu <i>DQA1</i>	50
5.2.2	Porovnání celkového methylačního stavu jednotlivých QAP alel	51
5.2.3	Porovnání methylačního stavu jednotlivých CpG míst QAP alel	54
5.3	Analýza relativní úrovně exprese mRNA genu <i>DQA1</i>	55
5.3.1	Srovnání rozdílu relativní úrovně exprese mRNA jednotlivých alel asociovaných s QAP promotory	56
5.3.2	Korelace relativní úrovně exprese mRNA genu <i>DQA1</i> a methylačního stavu promotoru QAP	58
5.4	Analýza methylačního stavu regulační oblasti genu <i>DQB1</i>	59
5.4.1	Porovnání celkového methylačního stavu regulační oblasti jednotlivých alel genu <i>DQB1</i>	60
5.4.2	Porovnání methylačního stavu jednotlivých CpG míst v oblasti intronu 1	61
6.	DISKUZE	63
7.	SOUHRN	66
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	68
9.	PŘÍLOHY	I

SEZNAM ZKRATEK

AK	aminokyselina
C	cytosin
CLIP	class II associated invariant chain peptide
CpG	dinukleotid cytosin-fosfát-guanin
dATP	2'- deoxyadenosin- 5'- trifosfát
dCTP	2'- deoxycytidin- 5'- trifosfát
dGTP	2'- deoxyguanosin- 5'- trifosfát
dNTP	deoxyribonukleotid trifosfát
dTTP	2'- deoxythymidin- 5'- trifosfát
DNMT	DNA methyltransferasa
G	guanin
H2A	histony H2A
H2B	histon H2B
H3	histon H3
H4	histon H4
HDAC	histondeacetyláza
HLA	lidské leukocytární antigeny
MBD	methyl vazebná doména
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
NLS	jaderný lokalizační signál
<i>PPIA</i>	gen kódující cyklofilin
QAP	promotor genu <i>DQAI</i>
T	thymi

1. ÚVOD

Epigenetická regulace je jedním z mechanismů, které ovlivňují úroveň genové exprese. Mezi základní epigenetické mechanismy patří methylace DNA, modifikace histonů a RNA interference. Methylace DNA v regulačních oblastech genů znemožňuje transkripci buď přímo tím, že brání vazbě transkripčního faktoru na DNA, nebo nepřímo, umožněním vazby reprimujících faktorů na DNA.

Stárnutí organismu je asociováno se změnami v methylaci DNA. S přibývajícím věkem ubývá methylace v intergenových oblastech, což zvyšuje nestabilitu genomu. Změny methylace však postihují také regulační oblasti genů, neboť byla prokázána u mnoha promotorů zvýšená úroveň methylace CpG ostrovů spojená se stářím.

Změny v methylaci regulační oblasti genů kódujících molekuly hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) II. třídy by mohly být jednou z příčin zvýšené predispozice k rozvoji autoimunitních onemocnění ve stáří. Molekuly MHC II. třídy totiž umožňují antigen prezentujícím buňkám předkládat antigeny exogenního původu pomocným T-lymfocytům a tím iniciují adaptivní imunitní odpověď. Regulace exprese molekul MHC je tedy klíčová a její porucha může vést k rozvoji autoimunitních onemocnění.

Rozdíly v úrovni exprese těchto genů nemusí být spojeny pouze se stárnutím organismu, ale protože jejich regulační oblasti podléhají vysoké variabilitě, je pravděpodobné, že methylace DNA bude odlišná také v regulačních oblastech jednotlivých alel.

2. PŘEHLED LITERATURY

2.1 Epigenetika

Epigenetika se zabývá studiem změn v genové expresi, které nejsou způsobeny změnou nukleotidové sekvence. Epigenetická regulace je důležitá pro správný vývoj, diferenciaci buněčných linií a udržení stability genomu. Epigenetika zajišťuje také genomický imprinting a inaktivaci jednoho z chromozomů X v samičích buňkách savců. Epigenetická regulace je ovlivňována dědičnými i vnějšími vlivy, či vlivem stárnutí. Epigenetické změny mohou být spojeny s nemocemi, a to s dědičnými, např. Rettův syndrom (Amir *et al.* 1999) i získanými, např. neoplazie (Baylin *et al.* 1998). Další nemocí, na které se podílí jak genetické predispozice, tak epigenetika je diabetes 1. typu (McFarlane *et al.* 2009). Mezi hlavní nástroje epigenetické regulace patří methylace DNA, acethylace histonů a RNA interference.

2.1.1 Methylace DNA

Methylace DNA je nejstarší známou epigenetickou modifikací (Holliday a Pugh 1975) a patří mezi klíčové epigenetické regulace savců. Je důležitá pro embryonální vývoj (Li *et al.* 1992), inaktivaci chromosomu X (Heard *et al.* 1997), genomický imprinting (Li *et al.* 1993) a chromozomální stabilitu (Eden *et al.* 2003). Poruchy methylace DNA jsou spojeny s mnoha onemocněními, například s rakovinou (Egger *et al.* 2004).

2.1.1.1 Výskyt methylace DNA

Methylace DNA se v savčích buňkách nachází na CpG dinukleotidech, a to hlavně na repetitivních sekvencích, např. na satelitní DNA a parazitických elementech. Regulační funkci mají CpG ostrovy, nacházející se v promotorech, či regulačních oblastech genů. Jako CpG ostrovy označujeme regiony delší než 500 párů bazí, které obsahují více než 55% GC, přičemž poměr CpG ku GpC je nejméně 0,6 (Takai a Jones 2003). Přibližně 60% lidských genů je regulováno pomocí CpG ostrovů (Antequera a Bird 1993).

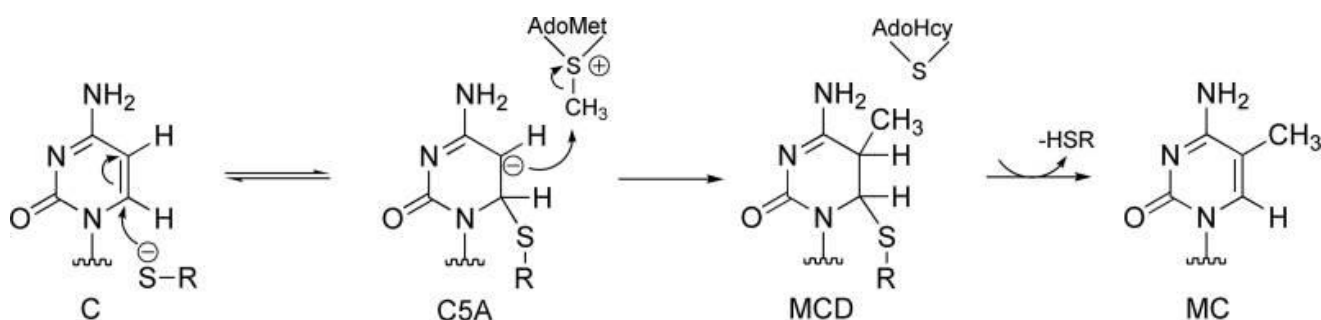
Hustota methylace promotoru určuje, zda bude gen regulován pomocí methylace těchto ostrovů. Weber *et al.* (2007) zkoumali 16 000 promotorů v lidských somatických a zárodečných buňkách. Jejich výzkum poukázal na to, že v případě somatických oblastí chudých na CpG ostrovy je většina CpG hypermetylována, ale přesto jsou tyto geny aktivní. Naopak v oblastech

bohatých na CpG ostrovy je DNA hypometylována, i když jsou tyto geny neaktivní. Pouze pro oblasti s nižším výskytem CpG ostrovů byla nalezena korelace mezi methylací a aktivitou genu. Dále zjistili, že promotory genů specifických pro zárodečné buňky jsou u somatických buněk methylovány.

2.1.1.2 Mechanismus methylace DNA

Methylace DNA u savců probíhá na pátém uhlíku cytosinu. DNA methyltransferázy přenáší methylové skupiny z S-adenosyl-metioninu na cytosin za vzniku 5-methylcytosinu a S-adenosylhomocysteinu. Hlavními zdroji methylových skupin jsou metionin, methylfolát a cholin. Methylová skupina S-adenosyl-metioninu je navázána na nabitý atom síry, který molekulu termodynamicky destabilizuje a tím umožňuje molekule velkou reaktivitu vzhledem k polarizovatelným nukleofilům a aktivovaným atomům uhlíku (Walsh 1979).

Methyltransferázy mají specifickou aktivitu k určité bázi DNA, báze DNA jsou však umístěny ve dvoušroubovici a methyltransferázy tak musí nejdříve vyklopit nukleotid ven z dvoušroubovice, to je umožněno rotací vazby mezi fosfátem a cukrem. Nukleotid je tak zpřístupněn aktivnímu místu methyltransferázy (Klimauskas *et al.* 1994). Na obr. 2.1 je znázorněn mechanismus methylace. Po zpřístupnění nukleotidu následuje nukleofilní atak uhlíku C6 cytosinu cysteinem 81 (Cys-81) nacházejícím se v aktivním místě enzymu za vzniku 6-Cys-81-S-cytosinového anionu a dále methylace uhlíku C5 cytosinu tohoto anionu methylovou skupinou S-adenosyl-metioninu za vzniku 5-methyl-6-Cys-81-S-5,6-dihydro -cytosinu a jeho následná deprotonace na 5-methylcytosin (Wu a Santi 1987).



Obr. 2.1: Reakční schéma methylace DNA. C = cytosin, C5A = 6-Cys-81-S-cytosinový anion, MCD = 5-methyl-6-Cys-81-S-5,6-dihydrocytosinu, MC = 5-methylcytosin, AdoMet = S-adenosyl-metionin, AdoHcy = S-adenosyl-homocystein. Převzato z Zhang 2006

2.1.1.3 DNA methyltransferázy

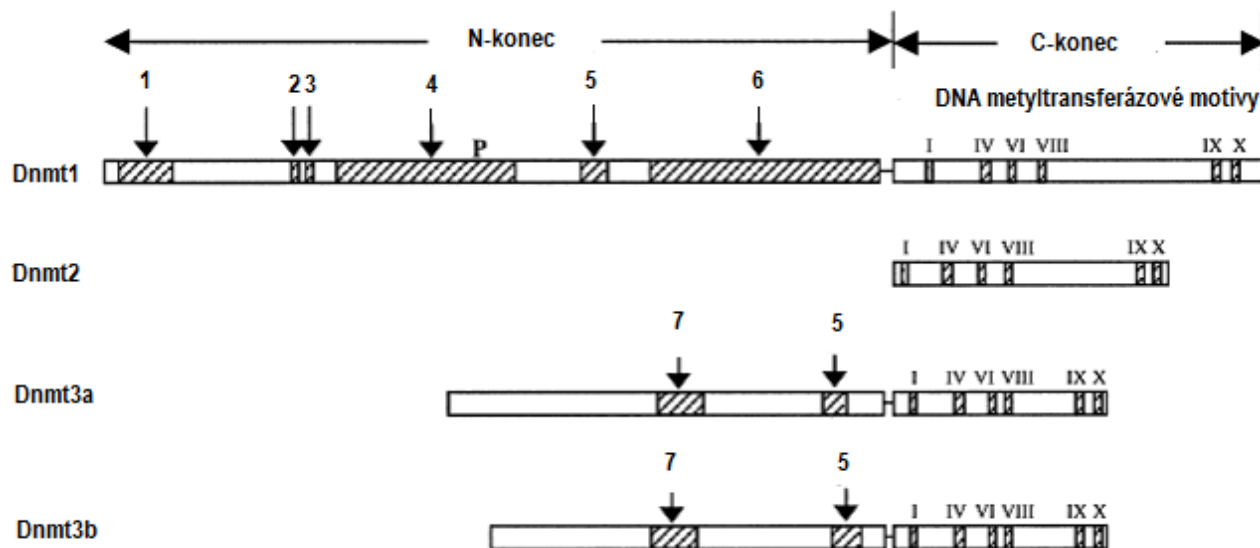
Methylace DNA je zajišťována třemi methyltransferázami, jsou to Dnmt1, Dnmt3a a Dnmt3b. Všechny methyltransferázy jsou esenciální během embryonálního vývoje a následně i pro udržování stability genomu. Inaktivace *de novo* methyltransferáz Dnmt3a a Dnmt3b, navozená během embryonálního vývoje, vede ke smrti embrya (Okano *et al.* 1999). Jsou však důležité také pro udržování methylace genomu, protože jejich knock-out způsobuje jeho demethylaci (Chen *et al.* 2003). Na druhé straně udržovací methyltransferáza Dnmt1 je esenciální nejen pro zachování methylace během replikace DNA, ale i pro embryonálního vývoj (Li *et al.* 1992).

Dnmt1 je řazena mezi udržovací methyltransferázy a methyluje cytosin na nově vzniklém vlákně DNA po replikaci (Li *et al.* 1992) nebo při opravě DNA (Mortusewicz *et al.* 2005). I když její aktivita na nemetylované DNA je 20x-30x nižší (Hermann *et al.* 2004), je nutná k *de novo* methylaci mimo CpG místa (Grandjean *et al.* 2007) a pravděpodobně přispívá i k *de novo* CpG methylaci (Feltus *et al.* 2003). Dnmt1 je 1620 aminokyselin (AK) dlouhý protein, jeho struktura je zobrazena na obr. 2.2. Na jeho C-konci se nachází katalytická doména, která obsahuje podobné sekvence jaké jsou u bakteriální methyltransferázy (Bestor *et al.* 1988). Na N-konci enzymu se nachází nukleární lokalizační signál, region směřující enzym k replikačnímu místu, CXXC doména zinkových prstů a polybromo homologní sekvence, která pravděpodobně zajišťuje protein-protein interakce a také by mohla napomáhat směřovat enzym k replikačnímu místu (Jeltsch 2002). N-konec obsahuje také vazebná místa pro některé další proteiny, např. PCNA nebo histondeacetylázy (Fuks *et al.* 2000, Chuang *et al.* 1997). Dnmt1 je regulována posttranslačními modifikacemi, a to fosforylací a methylací. Například methylace Dnmt1 na lysinu 142 snižuje stabilitu enzymu (Esteve *et al.* 2009). Caiafa *et al.* (2009) navrhli, že aktivita Dnmt1 by mohla být regulována i polymery přítomnými na PARP-1 (poly(ADP-ribose) polymerase 1), které ji nekovalentně vážou, a tím znemožňují její aktivitu.

Dnmt3a/b methylují DNA *de novo* (Gowher a Jeltsch 2002), což vysvětluje vyšší výskyt těchto methyltransferáz v embryonálních tkáních, zatímco jejich exprese v diferencovaných buňkách je velmi nízká (Robertson *et al.* 1999). Dnmt3a a Dnmt3b jsou 908 a 859 AK dlouhé proteiny, které obsahují variabilní region na N-konci, PWWP doménu, zinkovou doménu bohatou na cysteiny a C-terminální katalytickou doménu (obr. 2.2). PWWP doména se nachází u

proteinů důležitých pro diferenciaci a umožňuje nespecifickou vazbu na DNA (Qiu *et al.* 2002). Doména zinkových prstů se váže na histondeacetylázu 1 (Aoki *et al.* 2001).

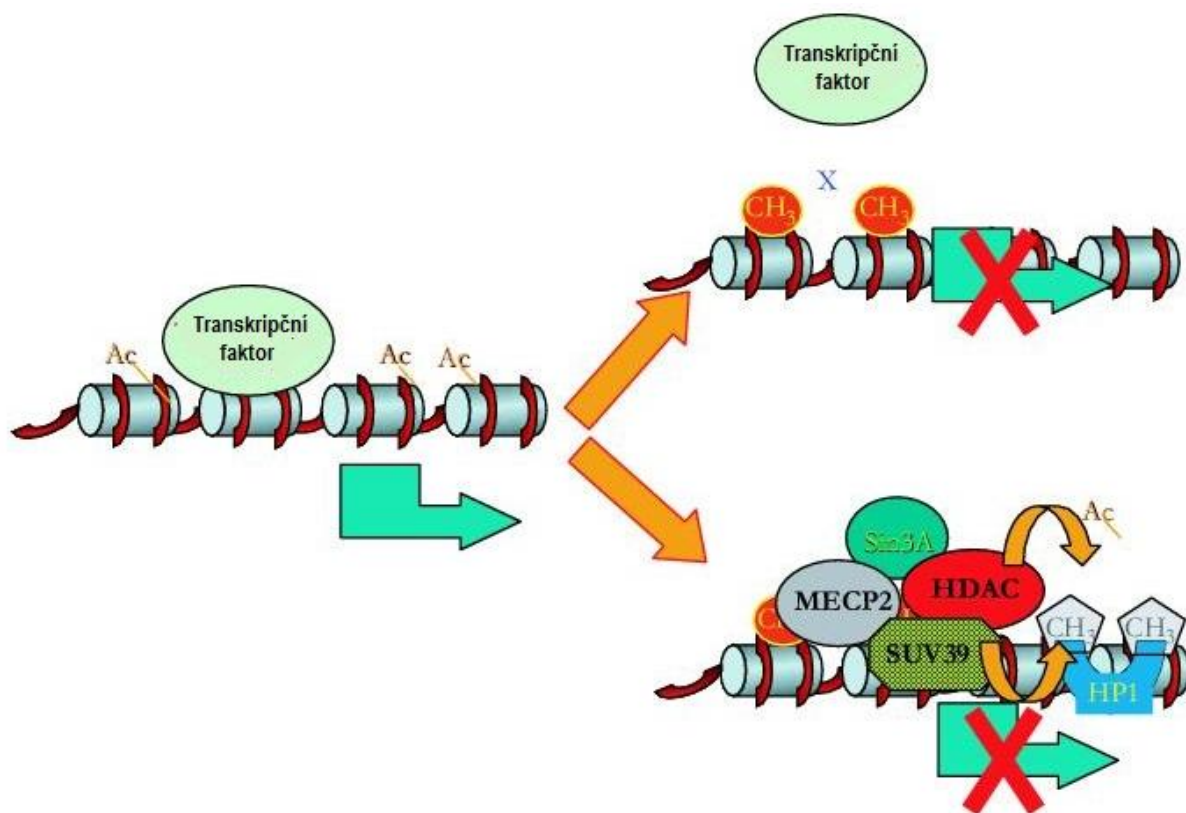
Aktivita methyltransferáz je regulována proteiny ICBP90 a Dnmt3L. ICBP90 rekrutuje Dnmt1 k hemiacetylované DNA a také interaguje s Dnmt3a/b. Dnmt3L je kofaktor *de novo* methyltransferáz a stimuluje jejich aktivitu (Suetake *et al.* 2004). Obsahuje zinkovou doménu stejně jako Dnmt3a/b, ale protože neobsahuje konzervovanou sekvenci na C-konci, nemá methyltransferázovou aktivitu. Methyltransferáza Dnmt2 je 391 AK dlouhý protein a její C-konec obsahuje stejné motivy jako ostatní methyltransferázy. I když zatím nebyla objevena její DNA methyltransferázová aktivita, bylo zjištěno, že Dnmt2 methyluje transferovou RNA pro aspartát (Goll *et al.* 2006).



Obr. 2.2: Schématické zobrazení struktury savčích methyltransferáz. 1 = nabitý region na N-konci, 2 = PCNA vazebné místo, 3 = nukleární lokalizační signál (NLS), 4 = sekvence směřující protein k replikačnímu místu, 5 = doména zinkových prstů, 6 = polybromo homologní sekvence, 7 = PWWP doména. Upraveno z Jeltsch 2002.

2.1.1.4 Efekty methylace DNA

Methylace DNA v promotorových oblastech genů způsobuje represi transkripce. Působí buď přímo tím, že brání navázání transkripčních faktorů, nebo pomocí methyl-CpG-vazebných proteinů, které rozpoznávají a následně se vážou na methylované CpG dinukleotidy (obr. 2.3).



Obr. 2.3: Schéma účinku methylace DNA na transkripci. Methylace ovlivňuje transkripci buď přímo tím, že znemožní navázání transkripčního faktoru na DNA, nebo vytvořením platformy pro navázání dalších faktorů. Upraveno z Szyf 2006.

Methyl-CpG-vazebné proteiny mají represivní aktivitu, mohou remodelovat chromatin a tím bránit transkripci. U savců je známo šest methyl-CpG-vazebných proteinů.

- MBD2 je komponentou methyl-CpG-vazebného proteinu 1 (MeCP1 = methyl-CpG-binding protein 1), který obsahuje i korepresorový komplex NuRD (Ng *et al.* 1999).
- MeCP2 je chromozomální protein lokalizovaný v místě methylované jaderné DNA. Jeho

MBD se nachází N-konci a transkripční represivní doména uprostřed. Ačkoli tento protein není potřebný k správnému embryonálnímu vývoji, genovému imprintingu, ani inaktivaci chromozomu X, bylo nalezeno několik genů, jejichž exprese byla snížena již při redukci MeCP2 o 10-20% (Tudor *et al.* 2002). MeCP2 je dále důležitý pro správný vývoj neuronů a jeho mutace vedou k Rettovu syndromu (Amir *et al.* 1999).

- MBD1 dokáže reprimovat transkripci methylovaného i nemethylovaného promotoru. Tento protein obsahuje dvě až tři kopie motivu CXXC, který je přítomný také v Dnmt1 a umožňuje asociaci s nemethylovanou DNA (Cross *et al.* 1997).
- MBD3 má stejnou genomickou strukturu jako MBD2 a produkty těchto genů jsou ze 70% identické. Přesto MBD3 neobsahuje methyl vazebnou doménu (Hendrich a Bird 1998). MBD3 je komponentou korepresorového komplexu NuRD (Wade *et al.* 1999).
- MBD4 je DNA glykosyláza, která snižuje mutabilitu methylovaných CpG v genomu (Millar *et al.* 2002).
- Protein Kaiso neobsahuje MBD doménu, ale váže se na methylované CGCG motivy pomocí domény zinkových prstů (Prokhortchouk *et al.* 2001).

2.1.2 Funkce histonů v epigenetické regulaci

DNA methylace je spojena s dalšími epigenetickými změnami, zvláště s modifikacemi histonů (Cedar a Bergman 2009). Modifikace histonů umožňují enzymům rozpoznat místa pro přestavbu chromatinu a tím regulovat transkripci genů. Nesprávná aktivita enzymů katalyzujících histonové modifikace je asociována s rakovinou (Esteller 2008). Chromatin existuje ve dvou formách, transkripčně aktivní euchromatin a inaktivní heterochromatin, které jsou regulovány pomocí epigenetických změn. Heterochromatin je kondenzovaná forma chromatinu (Elgin a Grewal 2003). Může se jednat o trvale umlčený heterochromatin nebo chromatin umlčený během určité fáze buněčného cyklu, či během vývoje. Typicky obklopuje centromerický region, obsahující hlavně repetitivní DNA sekvence.

2.1.2.1 Struktura chromatinu

Základní jednotkou chromatinu je nukleozom. Nukleozom obsahuje DNA a malé bazické proteiny histony. Jejich bazicita je způsobena zbytky bazických aminokyselin, které interagují

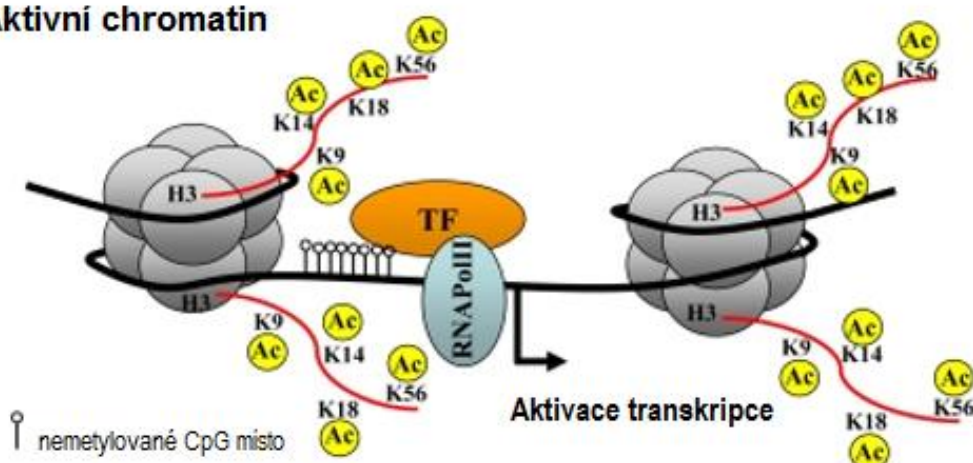
s negativně nabitými fosfátovými zbytky DNA. Nukleozom má v průměru asi 10 nm, v jádru nukleozomu se nachází oktamer histonů H2A, H2B, H3 a H4, z nichž každý se vyskytuje dvakrát. Kolem oktameru se dvakrát obtáčí DNA v rozsahu 147 páru bazí. Každý histon obsahuje globulární doménu a flexibilní aminokyselinový konec, který vyčnívá ze struktury nukleozomu (Lodish *et al.* 2003).

2.1.2.2 Posttranslační úpravy histonů

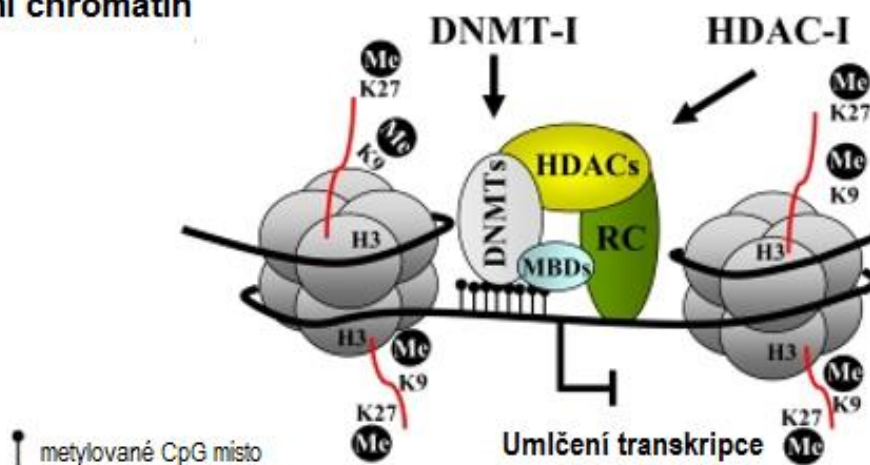
Aminokyselinový konec histonu obsahuje 11-37 AK a říká se mu histonový ocas. Lysiny a další aminokyseliny nacházející se v histonech, hlavně v histonu H3 a H4, mohou být na svém N-konci posttranslačně modifikovány biochemickými procesy, jako jsou acethylace, methylace, fosforylace a ubiquitinylace. Tyto modifikace vytvářejí nukleozomální variabilitu (histonový kód). Nejvíce prostudovány jsou acethylace a deacethylace, které zprostředkovávají enzymy histonacethylázy a histondeacethylázy. Histony mohou pak pomocí svých modifikací interagovat s různými proteiny a regulovat tak expresi či útlum genů.

Posttranslační modifikace histonů jsou zobrazeny na obr. 2.4. Neexistuje obecné pravidlo histonové genové regulace, ale je vyzníváno, že určité modifikace určitých aminokyselin jsou spojeny s určitou úrovní genové exprese. Například povšechná hyperacethylace a methylace lysinu 4 a lysinu 36 na histonu H3 (H3K4 a H3K36) aktivují genovou expresi, zatímco povšechná hypoacethylace a methylace lysinu 9 a lysinu 27 na histonu H3 (H3K9 a H3K27) a lysinu 20 na histonu H4 (H4K20) jsou spojeny s útlumem daného genu (Bernstein *et al.* 2007). Také methylace argininu ovlivňuje expresi genů. Methylace argininu 3 na histonu H4 (H4R3) a argininu 17 na histonu H3 (H3R17) indukují aktivaci genu (Bauer *et al.* 2002, Wang *et al.* 2001). Ubikvitinylace moduluje genovou expresi tím, že ovlivňuje methylační a acethylační status chromozomů (Osley *et al.* 2006). Kromě těchto modifikací pravděpodobně přispívá k epigenetické variabilitě i záměna „core“ histonů za jejich varianty. Tyto variantní histony byly zatím nalezeny jen pro histony H2A a H3.

Aktivní chromatin



Inaktivní chromatin



Obr. 2.4: Znázornění posttranslačních modifikací a DNA methylace aktivního a inaktivního chromatinu. Nukleozom se skládá z DNA a bazických proteinů histonů. Histony mají globulární doménu a fibrilární aminokyselinový konec, který může být modifikován různými posttranslačními modifikacemi. Upraveno z Leone 2008.

Uspořádání nukleozomu může být měněno pomocí cis a trans efektů kovalentně modifikovaných histonů. Cis efekty jsou umožňovány fyzikálními vlastnostmi kovalentně modifikovaných histonových konců. Trans efektem je navázání modifikačních proteinů na chromatin. Příkladem mohou být proteiny s bromodoménou, která rozpoznává acetylované histonové zbytky. Tato doména je často součástí enzymů histondeacetyláz. Dalším příkladem je chromodoména, rozpoznávající metylované zbytky lysinů. Modifikace histonů mohou být cílem i pro ATP-dependentní remodelující komplexy, které hydrolyzují ATP a umožňují přestavbu

chromatinu. Součástí těchto komplexů jsou například proteiny polycomb a trithorax. Polycomb katalyzuje trimethylaci H3K4me3 a tím aktivuje transkripci. Naopak trithorax trimethyluje H3K27me3 a tím genovou expresi inhibuje (Schuettengruber *et al.* 2007). Navození heterochromatinu napomáhá heterochromatin protein 1 (HP1), který se váže na represivní modifikaci histonu H3K9me3 a umožňuje propojení okolních histonů ve vysoce uspořádanou formu heterochromatinu (Jenuwein a Allis 2001).

2.1.2.3 Propojení methylace DNA a posttranslačních úprav histonů

Methylace DNA a posttranslační úpravy histonů spolu úzce souvisejí. Tyto dvě epigenetické regulace jsou propojeny pomocí methyl-CpG-vazebných proteinů, které umožňují vazbu histondeacetylázových komplexů k methylované DNA (Bird a Wolffe 1999). Také methyltransferázy obsahují na svém N-konci motiv, který umožňuje vazbu histondeacetyláz (Fuks *et al.* 2000, 2001).

Methylace histonů může iniciovat či bránit methylaci DNA. Přítomnost methylace H3K9 a absence methylace H3K4 navozuje methylaci DNA. Naopak methylace H3K4 pravděpodobně brání *de novo* DNA methylaci v somatických buňkách (Weber *et al.* 2007). Dnmt3L totiž interaguje s aminokyselinovým koncem histonu H3. Tato interakce je znemožněna methylací lysinu 4 na tomto histonu, ovšem ostatní modifikace histonu tuto interakci neovlivňují. Z těchto dat vyplývá, že funkcí Dnmt3L je zjišťovat, zda je na H3K4 přítomna methylace, neboť v její nepřítomnosti umožňuje methylaci DNA *de novo* (Ooi *et al.* 2007).

2.1.3 Modifikace epigenetické regulace v průběhu života

Na rozdíl od genetické informace se epigenom mění v průběhu života nejen vlivem mutací, ale především vlivem prostředí a stochastickými vlivy. Již během embryogeneze nastává proces přeprogramování zárodečných buněk. V průběhu života se epigenetická informace mění a její změny významně korelují s procesem stárnutí.

2.1.3.1 Epigenetická regulace během embryonálního vývoje

Epigenetika hraje důležitou úlohu během embryonálního vývoje. Již 4-6h po oplodnění je v zygotě zahájena aktivní demethylace paternálního genomu (Mayer *et al.* 2000). Podstata této demethylace je přeměna 5-methylcytosinu na 5-hydroxymethylcytosin dioxygenázou Tet3, která

pochází z oocyty (*Gu et al.* 2011). Během následných dělení buňky probíhá pasivní demethylace celého genomu zygoty (*Rougier et al.* 1998). Zárodečné buňky dávají po oplodnění vznik embryu, které prochází epigenetickým přeprogramováním, aby se zajistila totipotence prvních embryonálních buněk. Z nich později vznikající somatické buňky jsou již pluripotentní a během další diferenciaci procházejí řadou epigenetických změn, které určují vlastnosti terminálně diferencovaných buněk. Průběh postzygotických epigenetických změn byl podrobně popsán u myši (*Maatouk et al.* 2006). V sedmém dni embryonálního stadia mají myši zárodečné buňky stejné epigenetické modifikace jako somatické buňky, ale od poloviny sedmého dne postupně zaniká H3K9 dimethylace a také methylace DNA. Mezi desátým a dvanáctým dnem pak nastává v zárodečných buňkách nová vlna aktivní demethylace, během které je odstraňována methylace genů v jejich 5'-kódujících oblastech, které po první vlně demethylace zůstaly methylovány (např. geny *Ddx4*, *Sycp3*). Pokud embryo nemá DNA methyltransferázu *Dnmt1*, nejsou před druhou vlnou tyto geny reprimovány, což svědčí o významu methylace DNA v epigenetické regulaci zárodečných buněk (*Seki et al.* 2005).

Mezi epigenetické modifikace se počítá také imprinting. Na rozdíl od běžných epigenetických změn ovlivněných vnitřním i vnějším prostředím organismu, imprintované geny mají striktně stanovená pravidla modifikace (methylace DNA) podle parentálního původu. Proto i načasování aktivace imprintingu je zcela odlišné a probíhá zásadně preembryonálně ještě u gamet. Během desátého až dvanáctého dne vývoje jsou v gametách vymazány represivní epigenetické modifikace (methylace DNA) imprintovaných genů (*Li* 2002). Následně se podle pohlaví plodu vytváří nové na imprintovaných genech gamet (*Kafri et al.* 1992).

Samičí buňky savců obsahují dva chromozomy X, proto musí být exprese jednoho z X chromozomů kompenzována a tento chromozom umlčen. Tento proces zajišťují opět epigenetické mechanismy. V preimplantačním stádiu je selektivně umlčen X chromozom pocházející od otce (*Huynh et al.* 2003). V postimplantačních buňkách embryoblastu je X chromozom reaktivován (*Mak et al.* 2004), ale během migrace buněk je náhodně umlčen v zárodečných i somatických buňkách. Po migraci zárodečných buněk, gamet, k zárodečné liště je umlčený X chromozom opět reaktivován (*Tam et al.* 1994).

2.1.3.2 Epigenetické mutace

Epigenetické mutace, takzvané epimutace, se objevují díky menším rozdílům vznikajícím během přenosu a udržování epigenetické informace. Tyto změny se hromadí během buněčných dělení buňky (Bennet-Baker *et al.* 2003). V savčích buňkách byla při buněčném dělení odhadnuta 97-99% přesnost udržování methylace (Ushijima *et al.* 2003) a frekvence chyb ve střevních buňkách 2×10^{-5} na CpG za den (Yatabe *et al.* 2001).

2.1.3.3 Vliv prostředí

Důkazy, že epigenetický profil je ovlivňován prostředím, se týkají zejména důležité role výživy během embryonálního vývoje. Rakyan *et al.* (2002) zkoumali vliv výživy na embryonální vývoj myši. Do promotoru agouti genu, který normálně zodpovídá za hnědou barvu srsti, byl vložen retrotranspozon. Pokud byl retrotranspozon v promotoru hypermethylován – umlčen, barva srsti zůstala hnědá. Jeho hypomethylace – aktivace však způsobila žlutou barvu srsti a vedla k obezitě a nádorům. Zvýšená methylace agouti promotoru byla prokázána v případě, když matka embryí byla krmena potravinami bohatými na donory methylových skupin (kyselina listová, cholin, betain, vitamín B12, arginin nebo methionin). Korelace výživy a methylace byla nalezena také u včel. Dělnice a královna mají stejný genotyp, ale odlišná výživa vede ke snížení úrovně methylace DNA u královny a tím k odlišnému fenotypovému projevu a k výrazným somatickým rozdílům mezi královnou a dělnicemi (Kucharski *et al.* 2008).

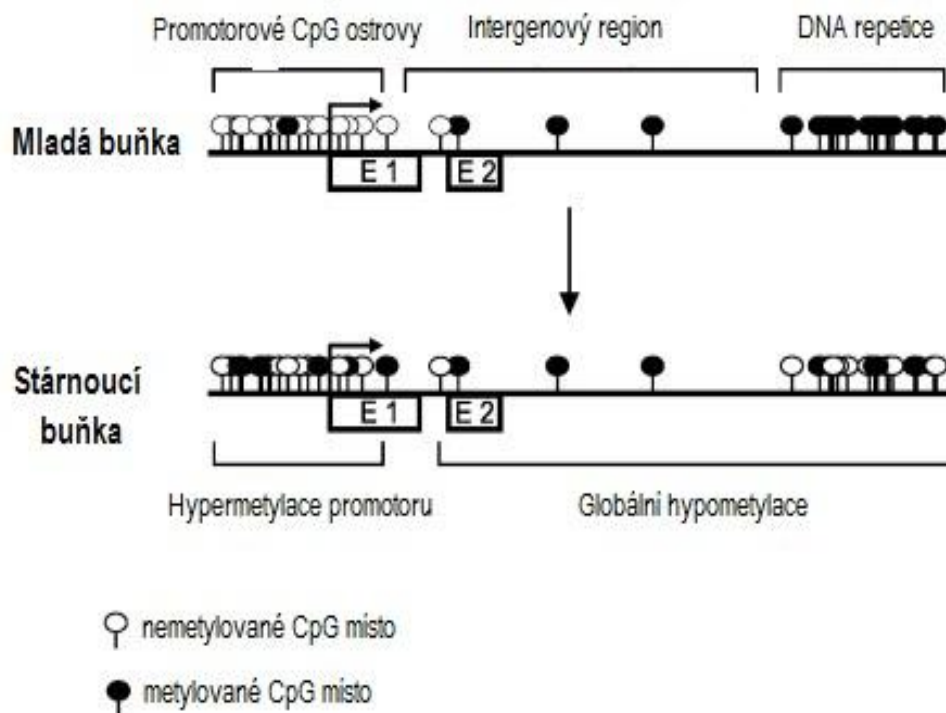
Nejen výživa, ale i mateřská péče může ovlivňovat epigenetický profil jedince. U myších mláďat, o které matky více pečovaly, ve srovnání s neopečovávanými mláďaty, byla nalezena nižší hladina methylace promotoru genu pro glukokortikoidní receptor a zároveň vyšší acethylace H3K4, což podporuje genovou transkripci. Epigenetická rozdílnost se projevila na chování mláďat. Mláďata pečujících matek byla více odolná vůči stresu (Weaver *et al.* 2004). Methylace DNA je ovlivňována také tabákovým kouřem (Breton *et al.* 2009), konzumací alkoholu (Zhang *et al.* 2010) a environmentálními polutanty (Baccarelli *et al.* 2009).

Významným důkazem, že epigenetické modifikace jsou ovlivňovány prostředím, je výzkum jednovaječných dvojčat, který ukázal, že čím méně času dvojčata trávila spolu a čím byla starší, tím se jejich epigenetický profil více lišil (Fraga 2005). Přesto však měla jednovaječná dvojčata ve tkáních podobnější DNA methylační epigenom než dvojčata dvojvaječná. Nejvíce dědičná CpG místa jsou ve funkčních regulačních oblastech a promotorech,

což naznačuje roli dědičnosti v regulaci methylačních signálů (Kaminsky *et al.* 2009). O genetické predispozici epigenetických regulací svědčí i výzkum provedený na vzorku nepříbuzné populace z Grónska a vzorku spřízněné populace z Utahu, který pokrýval tři generace. Obě populace vykazovaly rozdílnost DNA methylace spojenou s věkem, ale u spřízněné populace vykazovaly změny DNA methylace podobnější průběh (Bjornsson *et al.* 2008).

2.1.3.4 Změny epigenetické regulace spojené se stárnutím organismu

Johnson *et al.* (1999) charakterizovali stáří jako snížení schopnosti vypořádat se s fyziologickými vlivy, což nakonec způsobí smrt. K této snížené schopnosti zásadně přispívají epigenetické změny. U seniorů byla pozorována globální hypomethylace (Wilson *et al.* 1987), která byla prokázána i pro buňky imunitního systému (Golbus *et al.* 1990), zejména u genů (jejich promotorů) spojených s regulací zánětlivé odpovědi. Během stárnutí organismu dochází také k částečné reaktivaci inaktivních genů na chromozomu X a ke zvýšené expresi parentálně imprintovaných alel (Bennett-Baker *et al.* 2003). Dále s přibývajícím věkem se zvyšuje globální hypermethylace CpG ostrůvků nacházejících se v genových regulačních oblastech (Rakyan *et al.* 2010, Toyota *et al.* 1999). Zvýšenou methylaci DNA střevních buněk seniorů vykazuje 70% CpG ostrůvků genů exprimovaných ve střevě, jejichž methylace je součástí kaskády genetických a epigenetických změn vedoucích k rakovině tlustého střeva. Velké množství promotorů tumor supresivních genů (např. p14^{ARF}, p16^{ink4a}, gen pro receptor estrogenu) je ve stáří inaktivováno methylací DNA, což souvisí se zvýšenou predispozicí k rakovině v tomto období života (Issa *et al.* 1994, Shen *et al.* 2003, So *et al.* 2006). Ke zvýšené methylaci promotorů ve stáří dochází také i v bivalentních úsecích chromatinu. Věkové rozdíly v methylaci DNA znázorňuje obr. 2.5.



Obr. 2.5: Srovnání methylace DNA mladé a stárnoucí buňky. Stárnoucí buňka vykazuje hypermethyloci promotoru a globální hypomethyloci v intergenových regionech. Upraveno podle Huidobro *et al.* 2012.

Fraga a Esteller (2007) navrhli, že snížená aktivita udržovací methyltransferázy Dnmt1 vede k hypomethyloci intergenových oblastí a snaha organismu o kompenzaci by mohla vést k vyšší expresi *de novo* methyltransferáz Dnmt3a/b, což by vedlo k hypermethyloci promotorů (Fraga 2007).

Posttranslační modifikace histonů také vykazují změny spojené se stářím. Změny jsou způsobeny hlavně odlišnou aktivitou enzymů histonacetyláz, histondeacetyláz a methyltransferáz. Savčí histondeacetyláza SIRT1 acetyluje H4K16 a H3K9, přičemž významně ovlivňuje expresi tumor supresorového proteinu p53 (Pruitt *et al.* 2006, Vaquero *et al.* 2004). Snížená hladina enzymu koreluje se sníženou mitotickou aktivitou buňky. Bylo také prokázáno, že inhibice proteinů SIR rodiny vede k apoptotickým efektům specifickým pro nádorové buňky (Lara *et al.* 2009). Stárnoucí buňky vykazovaly zvýšenou hladinu methylace H4K20me3 (Fraga *et al.* 2007) a nižší hladinu polycomb komplexů, které inaktivují geny trimethylací H3K27 (Agherbi *et al.* 2009). Zvýšená methylace H4K20me3 u starších jedinců navozuje konstitutivní heterochromatin (Sarg *et al.* 2002) a je asociována se syndromem předčasného stárnutí (Shumaker *et al.* 2006). Dále byla pozorována snížená hladina methylace

H3K4me3, asociovaného s aktivací transkripce (Cheung *et al.* 2010). Epigenetické změny dospělých kmenových buněk, které se dále dělí, a tedy ovlivňují mnohem více buněk, než epigenetické změny terminálně diferencovaných buněk (Huidobro *et al.* 2012).

2.1.3.5 Vliv epigenetické regulace na délku života

Přestože je délka života mezi různými druhy živočichů daná hlavně genotypem, jsou i mezi jedinci stejného druhu rozdíly, jejichž příčinou je akumulace genetických i epigenetických chyb v dospělých kmenových buňkách. U nižších organismů bylo prokázáno, že epigenetika ovlivňuje délku života (Chang *et al.* 2002). Například zvýšená aktivita histondeacetylázy Sir2 prodlužuje délku života u *C. elegans* a *D. melanogaster* (Rogina *et al.* 2004, Tissenbaum *et al.* 2001). Nedávno provedený výzkum se zabýval porovnáním methylačního profilu lidí, kteří se dožili sta let, jejich potomků a potomků rodičů, kteří umřeli v nepříliš vysokém věku. Gentilini *et al.* (2012) zjistili, že oproti potomkům nedlouho žijících rodičů, potomci dlouho žijících rodičů netrpěli závažnými chorobami, měli vyšší globální metylaci a více methylované Alu sekvence. Při podrobném porovnávání methylace promotorů bylo identifikováno 150 hypermethylovaných a 67 hypomethylovaných genů, které měly odlišný methylační profil mezi potomky dlouho a nedlouho žijících rodičů a které pravděpodobně jsou zodpovědné za dlouhověkost a udržení zdraví ve vysokém věku.

2.2 Glykoproteiny hlavního histokompatibilního komplexu

Glykoproteiny hlavního histokompatibilního komplexu (MHC - major histocompatibility complex) jsou transmembránové molekuly, umožňující rozpoznání antigenu a jeho prezentaci pomocným a cytotoxickým T-lymfocytům (Hořejší a Bartůňková 2009). Lidské MHC molekuly se označují jako lidské leukocytární antigeny (HLA - human leukocyte antigens).

Geny MHC I. třídy kódují povrchové glykoproteiny, které se nacházejí téměř na všech buňkách organismu a prezentují antigeny cytosolického původu (vlastní peptidy, peptidy virového či bakteriálního původu atd.) CD8⁺ cytotoxickým T-lymfocytům. MHC I. třídy se skládají z α podjednotky a β_2 mikroglobulinu, který je kódován na 15. chromozomu.

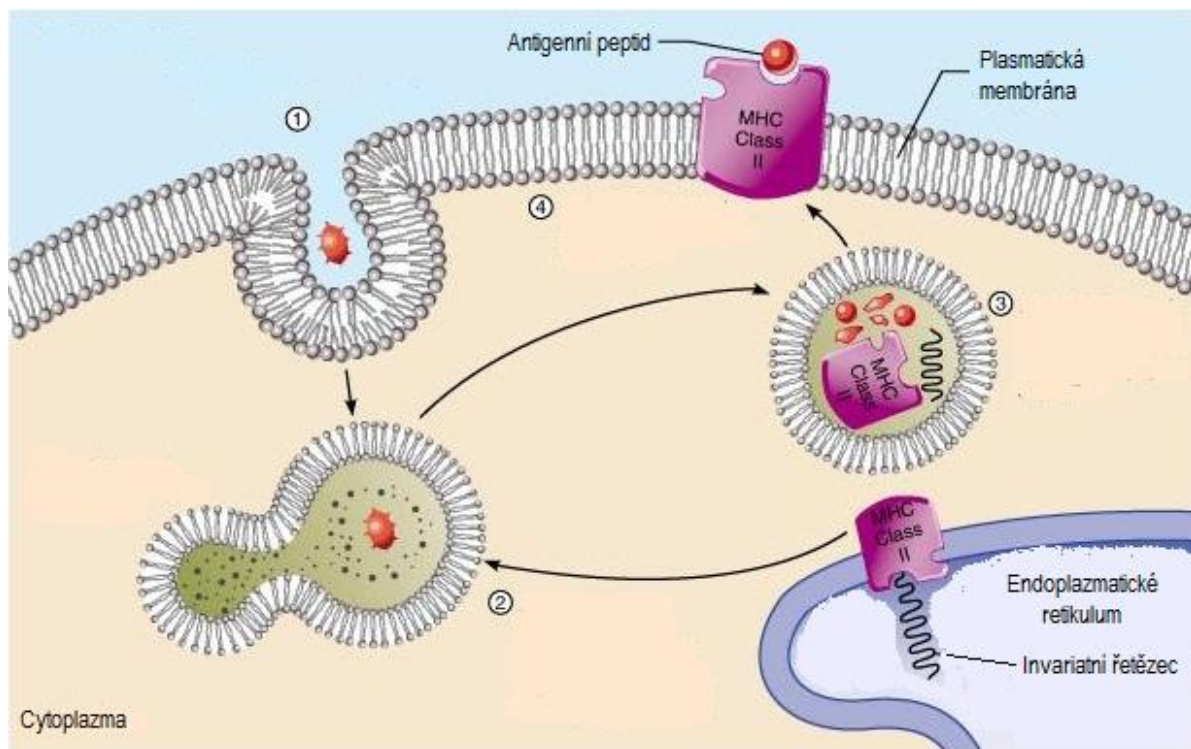
Geny MHC II. třídy kódují povrchové glykoproteiny α a β , které jsou exprimovány na povrchu antigen prezentujících buněk (dendritické buňky, makrofágy, B-lymfocyty), ale po stimulaci interferonem γ mohou být exprimovány dalšími buňkami. Prezentují antigeny

extracelulárního původu CD4⁺ pomocným T-lymfocytům a umožňují tak iniciaci adaptivní imunitní odpovědi.

2.2.1 Struktura molekuly MHC II. třídy

Molekula MHC II. třídy se skládá z 33-35 kDa dlouhého α -řetězce a 26-28 kDa dlouhého β -řetězce. Každý z těchto řetězců má dvě extracelulární domény (α_1, α_2 , β_1, β_2), z nichž každá obsahuje 90-100 AK, transmembránový úsek (20-25 AK) a intracelulární fragment (8-15 AK). Domény α_1 a β_1 jsou na rozdíl od domén α_2 a β_2 vysoce polymorfní. Jsou tvořeny antiparalelními β -listy a s nimi vázanými α -helixy, které tvoří vazebné místo pro peptid.

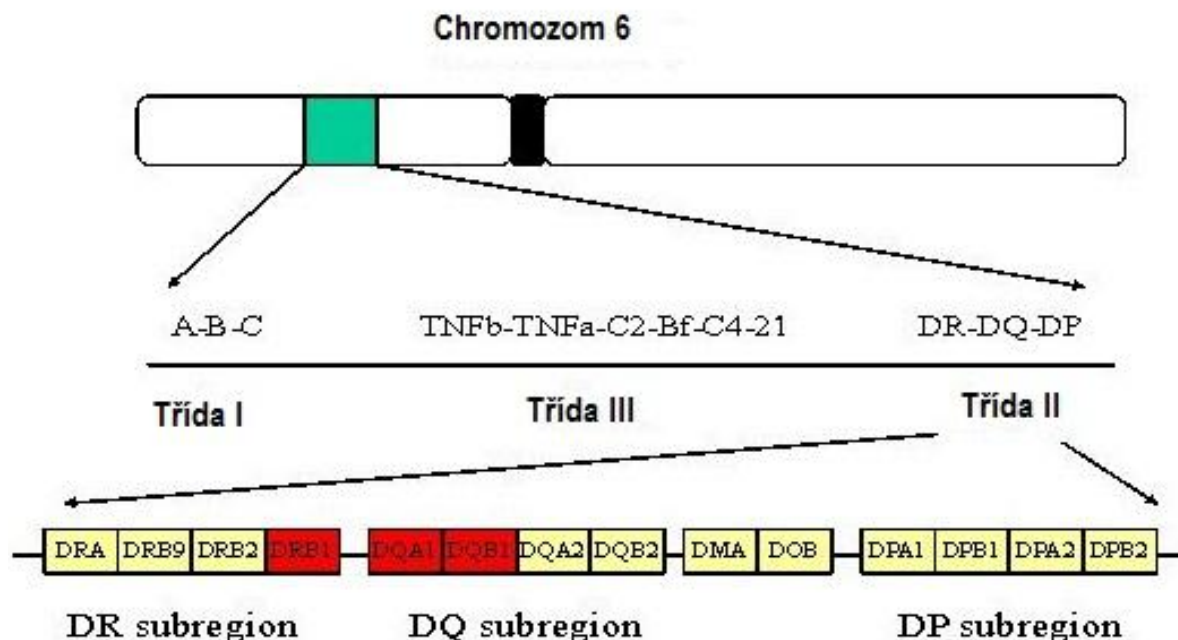
Formování molekuly MHC II. třídy v buňce je zobrazeno na obr. 2.6. Po translaci se α a β řetězce MHC II. třídy v endoplazmatickém retikulu spojí s invariantním řetězcem, jež se chová jako chaperon, který napomáhá správnému poskládání molekuly a zároveň znemožňuje navázání peptidů z endoplazmatického retikula do vazebného místa molekuly MHC II. třídy. Z endoplazmatického retikula je molekula transportována sekreční drahou do Golgiho aparátu. Váčky uvolněné z Golgiho aparátu fúzí s endozomy, které vznikají endocytózou extracelulárních proteinů. Po fúzi je invariantní řetězec, zpracovaný na fragment CLIP, zaměněn za antigenní peptid pocházející z endocytózy. Výměně napomáhá molekula DM. Molekula MHC II. třídy s peptidem je následně transportována na povrch cytoplazmatické membrány, kde je rozpoznávána CD4⁺ T-lymfocyty (Burmester a Pezzuto 2003).



Obr. 2.6: Schéma mechanismu prezentace antigenních peptidů molekulami MHC II. třídy.
 1 = vstup antigenu do buňky fagocytózou, 2 = fúze fagozomu a lysozomu, 3 = fúze MHC II. třídy s fagolysozomem a náhrada invariantního řetězce antigenním peptidem, 4 = migrace MHC molekuly s antigenním peptidem k cytoplazmatické membráně.

2.2.2 HLA genový komplex

Geny kódující MHC se u člověka rozprostírají na krátkém raménku 6. chromozomu, v místě definovaném 6p21.3 (obr. 2.7). Tento úsek je dlouhý asi 4 Mbp, nachází se na něm asi 160 genů a vyznačuje se vysokou hustotou genů, výrazným polymorfismem a malou frekvencí rekombinace. Díky existenci silné vazebné nerovnováhy se různé kombinace těchto genů/alel, nazývané haplotypy, přenášejí jako skupina společně z rodiče na potomka. Je velice dobře popsáno, že určité haplotypy i samotné alely jsou asociovány s výskytem autoimunitních onemocnění (Burmester a Pezzuto 2003). HLA geny jsou rozděleny do třech oblastí, oblast MHC I. třídy, oblast MHC II. třídy a oblast MHC III. třídy, kódující humorální faktory imunitních reakcí.



Obr. 2.7: Schématické zobrazení uspořádání HLA genů na chromozomu. HLA geny se nacházejí na krátkém raménku 6. chromozomu a rozdělují se do tří oblastí: I., II., III. třídy. Upraveno podle Gillespie 2012.

Každý gen HLA II. třídy zahrnuje pět exonů. První exon kóduje signální sekvenci nutnou pro zahájení translace, druhý a třetí exon kóduje extracelulární doménu, čtvrtý exon transmembránovou část a pátý exon cytoplasmatický konec molekuly. Kromě transmembránových glykoproteinů HLA-DR, DQ a DP, oblast HLA II, třídy kóduje molekuly HLA-DM a DO, které se nacházejí v endozomech antigen prezentujících buněk a napomáhají vazbě a prezentaci antigenního peptidu molekuly HLA II. třídy.

2.2.3 Regulace transkripce MHC II. třídy

Regulace transkripce MHC II. třídy je jeden z klíčových mechanismů kontroly exprese těchto molekul na povrchu antigen prezentujících buněk a tedy i způsob ovlivnění imunitní odpovědi. Bylo publikováno, že hustota těchto povrchových glykoproteinů je asociována s rizikem rozvoje autoimunitních onemocnění. Zvýšená exprese molekul MHC II. třídy totiž zvyšuje tendenci k rozvoji zánětlivé Th1 odpovědi. Avšak i snížená exprese může být spojena s autoimunitními chorobami, protože vede k snížené účinnosti prezentace antigenního peptidu CD4⁺ pomocným T-lymfocytům (Swanberg *et al.* 2005).

2.2.4 Exprese alel MHC II. třídy

Velice detailně byla studována exprese alel HLA DQ lokusu, v jehož promotorových oblastech byla nalezena vysoká různorodost (Andersen *et al.* 1991, Morzycka-Wroblewska *et al.* 1993), což korespondovalo s variabilní úrovní exprese jednotlivých alel DQ genů. V DQ oblasti se nacházejí geny *DQA1* kódující α řetězec a *DQB1* kódující β řetězec (Geny *DQA2* a *DQB2* jsou pseudogeny).

V lymfocytech periferní krve byla sledována úroveň exprese alel *DQA1* a byla pozorována následující hierarchie jejich exprese: 03 > 01 > 0201 > 05 (Donner *et al.* 2002). Vyšší expresi alely *DQA1**0301 potvrdil i další výzkum (Britten *et al.* 2009). V jiném pozorování nebyl nalezen rozdíl mezi expresí alel *DQA1* 01, 02, 03, 05, 06, ale byla potvrzena vyšší exprese alely 04 (Fernandez *et al.* 2003). Různorodé výsledky těchto výzkumů mohou být způsobeny rozdílnou metodikou výzkumu, typem zkoumaných buněk, či malým počtem vzorků jednotlivých alel (Britten *et al.* 2009). Kromě genové exprese byly analyzovány i epigenetické modifikace, methylace promotorů, alel *DQA1*. Byla nalezena nižší úroveň celkové methylace promotoru QAP 1.1, který je spojen s alelou *DQA1**0101, v porovnání s promotory QAP 1.4 (spojen s alelou *DQA1**0102) a QAP 4.1 (spojen s alelami *DQA1**0401, *0501) (Zajacová 2009).

V mononukleárních buňkách periferní krve byla sledována úroveň exprese alel *DQB1* a bylo zjištěno, že úroveň exprese alel *DQB1**06 byla vyšší než ostatních alel, zatímco úroveň exprese alel *DQB1* typu 02 byla nižší. Opět tyto výsledky mohou být ovlivněny metodikou výzkumu, typem zkoumaných buněk, či počtem vzorků jednotlivých alel (Britten *et al.* 2009).

2.2.5 Transkripční regulátory

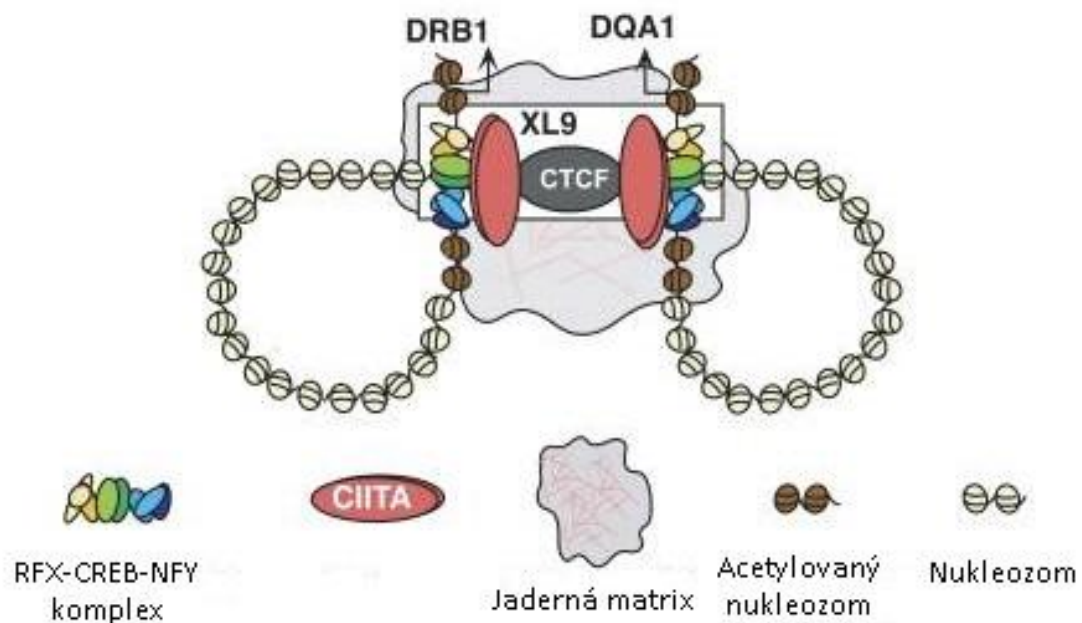
Transkripce genů MHC II. třídy je zprostředkována skupinou transkripčních faktorů:

- regulační faktor X (RFX – regulation factor X)
- protein vázající se na cAMP (CREB – cAMP response element binding protein)
- jaderný faktor Y (NFY – nuclear factor Y)

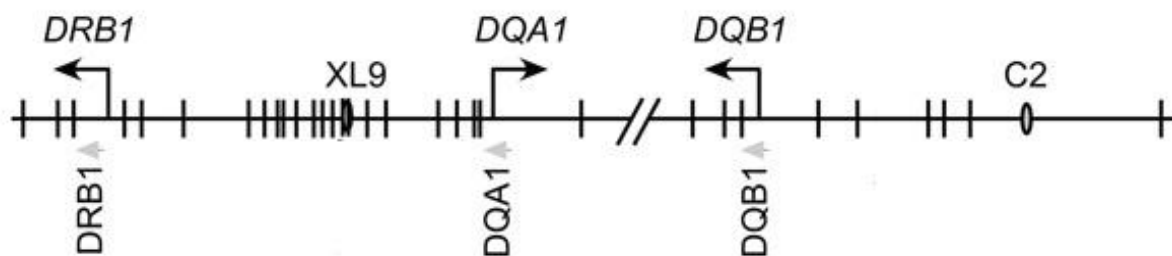
Transkripční faktory nasedají na X1, X2 a Y boxy nacházející se v blízkosti promotoru (Ting *et al.* 2002).

- faktor CIITA se neváže přímo na DNA, ale na transkripční faktory vázané na X a Y boxech, tento faktor zprostředkovává interakci mezi kofaktory, faktory remodelujícími chromatinovou strukturu a transkripčním komplexem (Beresford *et al.* 2001).

- transkripci MHC II. třídy ovlivňují i elementy nacházející se dále od promotorů. Jsou to místa vázající CCTCC transkripční faktor (CTCF). Vazba faktoru CTCF na DNA je ovlivněná methylací. Mezi HLA geny *DRB1* a *DQA1* se nachází místo XL9, na které se váže CTCF a způsobí tak vytváření chromatinových smyček mezi XL9 a X, Y boxy (obr. 2.8). Tím se umožní transkripce těchto DQ genů (Majumder *et al.* 2008). Nefunkčnost některých z těchto faktorů může vést k nejrůznějším chorobám. Majumder a Boss zjistili, že buňky pacientů s lymfocytickou leukémií exprimují pouze HLA DR geny, ale ne HLA DQ geny. Jako příčinu popsali metylaci CTCF vazebných míst, což zabraňuje vazbě CTCF a tím i MHC II specifických transkripčních faktorů k promotoru. Kromě toho objevili další místo vázající CTCF a nazvali jej C2. Místo C2 leží mezi HLA genem *DQB1* a pseudogenem *DQA2* (obr. 2.9), interaguje s XL9 a tvoří smyčky mezi HLA promotory *DQA1* a *DQB1* (Majumder a Boss 2011).



Obr. 2.8: Zobrazení propojení XL9 a X,Y boxů HLA genů pomocí CTCF. Upraveno podle Majumder 2008.



Obr. 2.9: Zobrazení pozice CTCF vazebných míst XL9 a C2. Upraveno podle Majumder a Boss 2011.

3. CÍLE PRÁCE

Předkládaná diplomová práce je součástí studie, která se zabývá epigenetickou regulací molekul hlavního histokompatibilního komplexu a její rolí v imunitním systému a stárnutí. Předpokladem je, že methylační stav regulačních oblastí genů tohoto komplexu bude odlišný u dětí, dospělých a seniorů a také, že úroveň exprese molekul hlavního histokompatibilního komplexu bude odlišná mezi generacemi.

V rámci této diplomové práce byly stanoveny následující cíle:

- analýza methylace promotorové oblasti genu *DQA1* a porovnání této celkové methylace a methylace jednotlivých CpG míst mezi generacemi a mezi promotorovými alelami jednotlivých věkových skupin
- analýza methylace regulační oblasti genu *DQB1* a porovnání této celkové methylace a methylace jednotlivých CpG míst mezi generacemi a mezi promotorovými alelami jednotlivých věkových skupin
- analýza relativní úrovně exprese alel genu *DQA1* a porovnání této úrovně mezi generacemi a mezi promotorovými alelami jednotlivých věkových skupin

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Použitý materiál

Chemikálie

agaróza	Serva, Německo
agaróza s nízkou teplotou tání	Sigma Aldrich, USA
ampicillin	Sigma Aldrich, USA
chlorid hořečnatý ($MgCl_2$)	Serva, Německo
chlorid sodný ($NaCl$)	Serva, Německo
chlorid vápenatý ($CaCl_2$)	Sigma Aldrich, USA
chloroform	Penta, ČR
destilovaná voda (dH_2O)	Ardeapharma, ČR
dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, USA
BSA (hovězí sérový albumin)	Sigma Aldrich, USA
dodecylsírán sodný (SDS)	Sigma Aldrich, USA
ethanol	Sigma Aldrich, USA
ethylendiamintetraacetát disodný (EDTA)	Sigma Aldrich, USA
GelRed barvivo	Biotium, USA
glukóza	Sigma Aldrich, USA
glycerol	Sigma Aldrich, USA
hovězí sérový albumin (BSA)	Sigma Aldrich, USA
hydroxid sodný ($NaOH$)	Penta, ČR
izopropanol	Sigma Aldrich, USA
isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Sigma Aldrich, USA
kyselina boritá	Sigma Aldrich, USA
kyselina chlorovodíková	Sigma Aldrich, USA
kyselina octová	Lach-Ner, ČR
Luria Bertrani agar	Sigma Aldrich, USA
Luria Bertrani medium	Sigma Aldrich, USA
molekulové standardy pro agarózovou elektroforézu	Fermentas, Kanada
	Norgen Biotek, Kanada
	Quiagen, Německo

octan draselný (KOAc)	Sigma Aldrich, USA
proteináza K	Sigma Aldrich, USA
sacharóza	Sigma Aldrich, USA
Tris base	Sigma Aldrich, USA
Triton X-100	Sigma Aldrich, USA
voda bez nukleáz	Sigma Aldrich, USA
5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal)	Sigma Aldrich, USA

Chemikálie pro PCR reakci

dNTP's (100 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	Fermentas, Kanada
10x Taq pufr s $\text{NH}_2(\text{SO})_4$	Fermentas, Kanada
25 mM MgCl_2	Fermentas, Kanada
Taq DNA polymeráza (5U/ μl)	Fermentas, Kanada

DNA primery

Amplifikace promotoru *DQA1*

Metabion International AG, Německo

F1- <i>DQA1</i> -d:	GGTTGTAAGTTAGAATATTTTGAAGGATG
R1- <i>DQA1</i> -d:	CAAACCAAACCTACCAAATCA
F1-DQA2-d:	AGGTTGTTTAGAAATGTTTATTTTGG
F1-DQA2-d:	AAAATCCCCTATAATAACATCTCAATTAC
F1- <i>DQA1</i> -k:	AGGTTGTTTAGAAATGTTTATTTTGG
R1- <i>DQA1</i> -k:	GTAATTGAGATGTTATTATAGGGGATTTT
F1-DQA2-k:	GATTATGAGGTTAGGAGTTTAAGATTAG
R1-DQA2-k:	GTTTTTTTTTAGGGTTTTTAATATAAATTTT

Amplifikace regulační oblasti *DQB1*

Metabion International AG, Německo

F1- <i>DQB1</i> :	TAAATTGGTGATTGTTATAGTTTAATTGGAATTTAGT
F1- <i>DQB1</i> :	CTCAAAAATCTCCGCCATTAATAATAACCATT
F2A- <i>DQB1</i> :	AGGGTAAATTTAGGTATGGGAAGGTAGGTAT
F2A- <i>DQB1</i> :	CTCCAAAACCTCCTTCTAACTATTCCAATACT
F2B- <i>DQB1</i> :	AGTATTGGAATAGTTAGAAGGAAGTTTTGGAG
F2B- <i>DQB1</i> :	AATATCTTATTTTCGCAACTATAATTACTAAATACCCTA

Colony PCR

Metabion International AG, Německo

SP6: GATTTAGGTGACACTATAGA

T7: TAATACGACTCACTATAGGG

Primery pro kvantitativní PCR

IDT, USA

*DQAI**01 F: GAAGGAGACTGCCTGGCG*DQAI**01 R: CATGATGTTCAAGTTGTGTTTTGC*DQAI**02 F: TTACGGTCCCTCTTGCCAGTT*DQAI**02 R: TTGCGGGTCAAATCTAAGTCTGT*DQAI**03 F: GGTCCCTCTGGGCAGTACAG*DQAI**03 R: CAAATTGCGGGTCAAATCTTCT*DQAI**04 F: GTACACCCATGAATTTGATGGAGAC*DQAI**04 R: CAGGATGTTCAAGTTGTGTTTTGTC*DQAI**05 F: GATGAGCAGTTCTACGTGGACCT*DQAI**05 R: GTAGAGTTGGAGCGTTTAATCAGAC*DQAI* total F: TACAGCTCAGAACAGCAACTGC*DQAI* total R: CCCACAATGTCTTCACCTCCA

DRA1 F: GGACAAAGCCAACCTGGAAA

DRA1 R: AGGACGTTGGGCTCTCTCAG

Lyofilizované primery byly nejprve rozpuštěny ve vodě na 100 μ M, před použitím byla koncentrace naředěna na 50 μ M (primery pro amplifikaci bisulfítované DNA) nebo 5 μ M (primery pro kvantitativní PCR). Použité primery byly částečně převzaty z článku Fernandez *et al* (2003) a částečně navržené de-novo.

Sondy pro kvantitativní PCR

IDT, USA

*DQAI**01: CCTGCGGGTCAAAACCTCCAAATTTG*DQAI**02,*03: CCACATAGAACTCCTCGTCTCCATCAAATTCAT*DQAI**04,*05: ACTGTCTGGTGTTCCTGTTCTCAGACAA

DRA1: CAACTATACTCCGATCACCAATGTACCTCCAGAG

Endogenní kontrola

Applied Biosystems, USA

Taq Man Gene Expression Assay hu PPIA: Hs04194521_s1

Bakteriální kmeny

Escherichia coli XL1-blue

Stratagene, Německo

endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[:Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15]
hsdR17(r_K⁻ m_K⁺)

Escherichia coli DH5α

Merck, Německo

F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169,
hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), λ⁻

Vektor

pGEM-T

Promega, USA

Apr, oriV ColE1 lacZ, 3015 pb

4.2 Techniky a metodické postupy

4.2.1 Subjekt studie

Zkoumaný soubor, který postihuje průřez populace, byl tvořen 62 dárci krve bez autoimunitního onemocnění. Plná periferní krev byla odebrána 17 zdravým dárčům ve věku 5-10 let, 30 zdravým dárčům ve věku 23-30 let a 15 zdravým dárčům ve věku 60-77 let, viz tabulka 4.1. Z krve dárců byla izolována DNA a RNA. DNA byla použita pro methylační analýzu, RNA pro kvantifikaci genové exprese.

Tabulka 4.1: Rozdělení vyšetřovaného souboru

skupina	děti	studenti	senioři
počet subjektů ve skupině	17	30	15
průměrný věk	7	25	66
věkový rozptyl	5-9 let	23-30 let	60-77 let
počet žen	8	20	13
počet mužů	9	10	2

4.2.2 Metody zpracování DNA

Jako první byla ze vzorků krve izolována DNA. Po izolaci DNA byla provedena genotypizace pro určení sérologických skupin dárců. DNA byla následně bisulfitována a cílový úsek byl amplifikován pomocí nested PCR. Namnožený úsek byl zaklonován do bakteriálního vektoru, bakteriální kolonie ověřeny a odeslány na sekvenaci.

4.2.2.1 Izolace DNA

Roztok pro lýzu erytrocytů (RCLB)

5 mM MgCl₂

320 mM sacharóza

1% (w/V) Triton X-100

12 mM Tris-HCl, pH 8

Roztok pro lýzu leukocytů (WCLB)

120 mM EDTA, pH 8

375 mM NaCl

DNA byla izolována vysolovací metodou dle Millera *et al.* (1988). V prvním kroku izolace byly dezintegrovány membrány erytrocytů. Poté dezintegrací leukocytární membrány proteinázou K za přítomnosti dodecylsulfátu sodného byla získána směs proteinů a DNA. Následně, po přidání NaCl, byla DNA tzv. vysolena z roztoku. V posledním kroku přidání 96 % etanolu vedlo k precipitaci DNA. Veškeré centrifugační kroky byly provedeny při 18 000 x g v centrifuze Z 300 (Hermle, Německo). Použitý 100% i 70% ethanol byly předem vychlazeny na -20 °C.

1. K 0,5 ml vzorku plné krve s EDTA byl přidán pufr RCLB a buňky byly stočeny na centrifuze po dobu 6 min.
2. Po odebrání supernatantu byla peleta promyta 1 ml dH₂O a odstředěna 2 minuty.
3. Předchozí krok byl 2x zopakován.
4. Peleta z posledního kroku byla resuspendována v 235 µl dH₂O, 80 µl WCLB, 40 µl 10% SDS a 15 µl proteázy K. Vzorky byly poté za stálého míchání inkubovány 30 minut při 55 °C v biologickém termostatu BT 120L (Laboratorní přístroje Praha, ČR).
5. Po zchlazení na pokojovou teplotu bylo přidáno 120 µl 5 M NaCl, vzorky byly intenzivně protřepány a odstředěny po dobu 3 minut.

6. Poté byl odebrán supernatant a vzorky byly opět odstředěny pro odstranění veškerých nečistot.
7. K supernatantu byl přidán 100% ethanol a DNA byla precipitována inkubací (30 minut) na ledu.
8. Vzorky byly odstředěny 3 minuty, DNA byla promyta 70% ethanolom a odstředěna.
9. Po vysušení pelety bylo k DNA přidáno 100 μ l dH₂O.

4.2.2.2 Stanovení koncentrace a čistoty DNA

Kvalita a kvantita DNA byla stanovena spektrofotometricky pomocí nanofotometru (Implen, Německo) v křemenných kyvetách při vlnové délce λ 260. Kontaminace proteiny a RNA byla určena porovnáním podílu absorbancí A₂₆₀/A₂₈₀ a A₂₆₀/240 v doporučeném rozmezí pro čistotu DNA přibližně 1,8.

4.2.2.3 Agarózová elektroforéza v TBE pufru

10x TBE pufr

890 mM Tris base

890 mM kyselina boritá

20 mM EDTA, pH 8

Pro identifikaci DNA a separaci jednotlivých PCR produktu byla použita horizontální agarózová elektroforéza v TBE pufru. Vzorky byly společně s molekulovým standardem naneseny na 1 až 2% agarózový gel obsahující interkalační činidlo GelRed a po rozdělení v elektrickém poli vizualizovány pod UV světlem. Elektroforetická separace probíhala při konstantním napětí 5 V/cm. Pro vizualizaci byl použit UV transluminátor MUVB 20 (UltraLum, USA) s kamerou Gel logic (Kodak, USA)

4.2.2.4 Genotypizace HLA molekul

Genotypizace HLA-molekul byla provedena pomocí kitů Olerup HLA SSP (GenoVision, USA). Pro určení sérologické skupiny HLA-DRB1 byl použit kit *Olerup* SSPTM DR low resolution. Sérologická skupina HLA-DQ byla určena pomocí *Olerup* SSPTM DQ low resolution, podtypy HLA-*DQA1* a HLA-*DQB1* byly určeny pomocí kitů *Olerup* SSPTM *DQA1* a *Olerup* SSPTM

*DQBI**02, *03, *04, *05 nebo *06. HLA alely byly určeny dle interpretační tabulky daného HLA Olerup SSP® kitu

1. Pro každý testovaný vzorek byla připravena reakční směs podle tabulky 4.2 a rozpipetována po 10 µl do jamek kitu, ve kterých se nacházely jednotlivé primery.
2. PCR reakce proběhla podle tabulky 4.3 v cykleru LabCycler gradient SensoQuest (Scholler, Německo) nebo C1000TM (Biorad, USA).
3. Po amplifikaci byl celý objem reakční směsi nanesen na 2% agarózový gel a byla provedena elektroforéza v TBE pufru. Sérologický typ byl určen porovnáním specifických produktů reakcí s interpretační tabulkou dodanými výrobcem kitu.

Tabulka 4.2: Složení reakční směsi pro genotypizaci pro 1 jamku kitu.

složka	objem
dH ₂ O	5,166 µl
PCR Mix	3,150 µl
DNA	2,100 µl
Taq polymeráza	0,084 µl

Tabulka 4.3: Teplotní program pro genotypizaci.

krok	teplota	čas	počet cyklů
počáteční denaturace	94 °C	120 s	
denaturace	94 °C	10 s	10
hybridizace a elongace	65 °C	60 s	10
denaturace	94 °C	10 s	20
hybridizace	61 °C	50 s	20
elongace	72 °C	30 s	20

4.2.2.5 Bisulfitová konverze DNA

Během bisulfitové konverze je pomocí hydrogensířičitanu sodného přeměněny nemetylovaný cytosin na uracil, který je následně během PCR reakce nahrazen thyminem. Metylované cytosiny zůstávají nezměněny, což při následné sekvenaci umožňuje určit metylovaná CpG místa. Pro bisulfitovou konverzi byl použit Epitect® Bisulfite kit. Všechny centrifugační kroky, pokud není

uvedeno jinak, byly provedeny při maximální rychlosti otáček po dobu 1 minuty na centrifuze MPW-51 (Mechanika Precyzyjna, Polsko).

1. Reakční směs byla připravená dle tabulky 4.4 v 500 µl PCR zkumavkách, a probíhala v cykleru C1000TM (Biorad, USA), za podmínek podle tabulky 4.5.
2. Po proběhnutí reakce byla DNA přečištěna. Reakce byla přenesena do 1,5 ml zkumavky a bylo přidáno 560 µl BL pufru. Tato směs byla přepipetována do EpiTect kolonek a odstředěna.
3. Frakce ve sběrné zkumavce byla vylita, na kolonku naneseo 500 µl pufru BW a zkumavky odstředěny.
4. Frakce ve sběrné zkumavce byla opět vylita, na kolonku bylo naneseo 500 µl pufru BD a směs inkubována 15 minut při pokojové teplotě, poté byla zkumavka odstředěna.
5. Frakce ve sběrné zkumavce byla vylita a na kolonku naneseo 500 µl pufru BW a zkumavka byla odstředěna. Krok 5 byl zopakován pro odstranění přebytečného ethanolu
6. Kolonka byla vložena do nové sběrné zkumavky a odstředěna.
7. Kolonka byla vložena do 1,5 ml centrifugační zkumavky, doprostřed membrány bylo naneseo 20 µl dH₂O a DNA eluována 1 minutu při 15 000 x g. Po eluci byla změřena koncentrace nanofotometrem (Implen, Německo) a DNA byla skladována při -20 °C.

Tabulka 4.4: Složení reakční směsi pro bisulfitovou konverzi

složka	objem
Bisulfite Mix	85 µl
DNA Protect Buffer	35 µl
dH ₂ O	*
DNA	*

* do reakce byl přidán maximálně 1 µg DNA a reakce byla doplněna vodou do konečného objemu 140 µl.

Tabulka 4.5: Teplotní program pro bisulfitovou konverzi

krok	teplota	čas
denaturace	95 °C	5 min
inkubace	60 °C	25 min
denaturace	95 °C	5 min
inkubace	60 °C	85 min
denaturace	95 °C	5 min
inkubace	60 °C	175 min

4.2.2.6 Amplifikace produktu pomocí nested PCR

Během ošetření DNA bisulfitem jsou nemetylované cytosiny přeměněny na tyminy, což snižuje komplexitu DNA. Z tohoto důvodu byla pro amplifikaci jednotlivých HLA alel použita nested PCR. Nejdříve byly amplifikovány jednotlivé promotory genu *DQA1*. Vnější primery nasedají v pozicích -729 a -87, vnitřní v pozicích -670 a -126. Z důvodu vysokého výskytu CpG ostrovu u genu *DQB1* byla pro amplifikaci zvolena část obsahující exon 1, intron 1 a část exonu 2. Tento úsek byl příliš dlouhý, proto byl rozdělen na dvě části. Vnější primery jsou společné a nasedají v místech 911 a 2428, vnitřní primery prvního úseku (úsek A) nasedají v pozicích 1057 a 1761, druhého úseku (úsek B) v pozicích 1730 a 2343. PCR reakce pro všechny produkty byla připravena podle tabulky 4.6 a probíhala při programu v cyklu, který je uveden v tabulce 4.7 pro gen *DQA1* a v tabulce 4.8 pro gen *DQB1*. Reakce probíhaly v tripletech, aby se zvýšila pravděpodobnost zachycení obou alel vzorku a aby bylo v analýze zahrnuto co nejvíce buněčných linií. Po proběhnutí druhé PCR reakce bylo na agarozové elektroforéze v TBE pufru ověřeno, zda se požadovaný produkt amplifikoval.

Tabulka 4.6: Složení reakční směsi pro amplifikaci cílového úseku genu

složka	reakce 1	reakce 2
	objem [µl]	objem [µl]
dH ₂ O	13,25	14,75
10x Taq pufr s NH ₂ SO ₄	2,50	2,50
MgCl ₂ (25 mM)	6,00	4,00
dNTP's (10 mM)	1,25	1,25
primery	0,40	0,40
Taq polymeráza	0,20	0,20
DNA	1,00	1,50

Tabulka 4.7: Teplotní program pro amplifikaci promotorové oblasti genu *DQAI*

krok	reakce 1			reakce 2		
	teplota	čas	počet cyklů	teplota	čas	počet cyklů
počáteční denaturace	95 °C	5 min		95 °C	5 min	
denaturace	95 °C	1 min	40	95 °C	1 min	50
hybridizace	56 °C	1,5 min	40	61 °C	1,5 min	50
elongace	72 °C	1 min	40	72 °C	1 min	50
závěrečná inkubace	72 °C	10 min		72 °C	10 min	

Tabulka 4.8: Teplotní program pro amplifikaci regulační oblasti genu *DQBI*

krok	reakce 1			reakce 2A/2B		
	teplota	čas	počet cyklů	teplota	čas	počet cyklů
počáteční denaturace	95 °C	5 min		95 °C	5 min	
denaturace	95 °C	1 min	40	95 °C	1 min	50
hybridizace	60 °C	1,5 min	40	61/58 °C	1,5 min	50
elongace	72 °C	1 min	40	72 °C	1 min	50
závěrečná inkubace	72 °C	10 min		72 °C	10 min	

4.2.2.7 Izolace a přečištění PCR produktu

Agarózová elektroforéza

50x koncentrovaný zásobní roztok TAE pufru:

2 M Tris base

50 mM EDTA, pH 8

5,7% (V/V) kyselina octová

Vzorky určené ke klonování byly rozdělené v 1% gelu z agarózy s nízkým v TAE pufru a produkt správné velikosti vyřezán.

Přečištění PCR produktu

Vzorky byly po vyřezání z gelu přečištěny pomocí QIAquick® Gel Extraction Kit (QUIAGEN, USA). Všechny následující kroky probíhaly při 17 900 x g po dobu 1 minuty v centrifuze MPW-51 (Mechanika Precyzyjna, Polsko).

1. K vyřezanému gelu byl přidán pufr QC v hmotnostním poměru 1:3 (gel:pufr QC) a vzorky byly inkubovány při 50 °C po dobu 10 minut (do rozpuštění).
2. K vzorkům byl přidán 100% izopropanol v hmotnostním poměru 1:1 (gel:izopropanol), vzorky byly napipetovány na MinElute kolonku a směs byla odstředěna.
3. Frakce ve sběrné zkumavce byla vylita, na kolonku naneseo 500 µl pufru QG a zkumavka odstředěna
4. Frakce ve sběrné zkumavce byla vylita, na zkumavku naneseo 750 µl pufru PE, směs byla 5 minut inkubována a odstředěna.
5. Frakce ve sběrné zkumavce byla vylita a zkumavka odstředěna 1 minutu při 10 000 x g pro odstranění zbytků ethanolu.
6. Kolonka byla vložena do nové 1,5 ml centrifugační zkumavky, doprostřed membrány bylo naneseo 10 µl dH₂O. DNA byla eluována 2 min při pokojové teplotě a poté centrifugována. Nakonec byla změřena koncentrace DNA a vzorky byly uloženy při -20 °C.

4.2.2.8 Klonování

Vyizolovaný PCR produkt byl následně klonován. PCR produkt byl ligován s pGEM – T vektorem, kterým byly transformovány bakterie *E.coli* DH5α nebo *E.coli* XL1-Blue.

Příprava kompetentních buněk

Pro přípravu byly použity buňky *E. coli* XL1-blue. Centrifugační kroky probíhaly na centrifuze Z 300 (Hermle, Německo) při 4 °C a 3 500 x g po dobu 5 minut.

1. Do 3 ml LB média byly zaočkovány buňky *E. coli* XL1-blue. Inokulum bylo kultivováno v inkubátoru NB205-QF (N-Biotek, Korea) 16-18 hodin při 37 °C a 250 x rpm.
2. Do sterilní baňky ze 100 ml LB média o teplotě 37 °C, bylo přidáno 1 ml inokulum a baňka byla vložena do inkubátoru. Během inkubace byla sledována optická denzita při 600 nm a po dosažení hodnoty 0,3-0,6 byl růst bakterií zastaven přenesením buněk na led.
3. Médium bylo inkubováno 10 minut na ledě, přeneseno do vychlazených sterilních polypropylenových zkumavek a buňky byly sesbírány 10 minutovou centrifugací
4. Peleta byla resuspendována v 25 ml vychlazeného, sterilního 0,1 M CaCl₂ a směs byla odstředěna.

5. Peleta byla resuspendována v 25 ml vychlazeného, sterilního 0,1 M CaCl₂, inkubována 30 minut na ledě a odstředěna.
6. Peleta byla resuspendována ve 3 ml vychlazeného, sterilního roztoku 0,1 M CaCl₂ a 20% glycerolu.
7. Kompetentní buňky byly přeneseny po 100 µl do 1,5 ml sterilních zkumavek a okamžitě ponořeny do roztoku ethanolu vychlazeného na -80 °C.
8. Buňky byly skladovány při -80 °C v hlubokomrazicím boxu E310 (New Brunswick, UK)

Ligace

Pro ligaci byl použit vektor pGEM®-T (Promega, USA). Jedná se o linearizovaný vektor, který má na 3' konci tymidinové přesahy. Poměr insertu k vektoru během ligace byl 3:1. Množství DNA vstupující do reakce bylo vypočítáno následovně:

$$ngDNA = \frac{ngVEKTOR \times kbINZERT \times 3}{kbVEKTOR}$$

Ligační reakce byla připravena podle tabulky 4.9. Reakce probíhala při 4 °C přes noc.

Tabulka 4.9: Složení ligační směsi

složka	objem
dH ₂ O	*
2x Rapid Ligation Buffer	2,5 µl
pGEM-T vektor	0,5 µl
T4 ligáza	0,5 µl
PCR produkt	*

* do reakce bylo vloženo množství PCR produktu odpovídající 14 ng (*DQA1*), 16ng (DQA úsek A) nebo 15 ng (*DQA1* úsek B) a směs byla doplněna vodou do konečného objemu 5 µl.

Transformace kompetentních buněk teplotním šokem

Kompetentní bakterie byly transformovány ligační směsí pomocí teplotního šoku. Transformované buňky byly rozetřeny na Petriho misky se sterilním LB médiem, ampicillinem (0,1 mg/l), X-galem (0,03 mg/l) a IPTG (0,024 mg/l).

1. Kompetentní bakterie byly rozmrazeny na ledu, byl přidán celý objem ligační směsi a následně buňky byly inkubovány 20 minut na ledu.

2. Po inkubaci byly buňky vloženy na 45 sekund do vody o teplotě 42 °C a následně byly ponechány nejméně 2 minuty na ledu.
3. K bakteriálním buňkám bylo přidáno 950 µl sterilního LB média a směs byla inkubována 1,5 hodinu při 37 °C a 150 x rpm v inkubátoru NB205-QF (N-Biotek, Korea).
4. Směs byla rozetřena LB misky s ampicilinem, X-galem a IPTG po 100 a 200 µl.
5. Zbylá směs byla odstředěna při 5 000 x g po dobu 2 minut, peleta resuspendována a rozetřena na LB misky s ampicilinem, X-galem a IPTG.
6. Petriho misky byly vloženy do inkubátoru a kultivovány při teplotě 37 °C přes noc.

Ověření bakteriálních kolonií pro sekvenaci

Přítomnost vektoru s insertem v kolonii byla ověřena metodou Colony PCR a následnou agarózovou elektroforézou. Transformované bakteriální kolonie byly vybrány na základě barevné selekce a následné Colony PCR

1. Bílé kolonie byly nabrány špičkou a přeneseny do zkumavek.
2. Ke koloniím byla přidán PCR mix s primery SP6 a T7, který byl připraven podle tabulky 4.6 (reakce 2).
3. Vzorky byly vloženy do cykleru ve kterém byl nastaven program uvedený v tabulce 4.10.
4. Velikost produktu PCR byla ověřena pomocí agarózové elektroforézy v TBE pufru.

Některé kolonie nebylo možno ověřit metodou Colony PCR, proto z nich byl izolován plazmid pomocí kitu QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN, USA) a tento plazmid byl použit jako templát PCR reakce s primery SP6 a T7. Všechny centrifugační kroky izolace plazmidu, pokud nebylo uvedeno jinak, probíhaly v centrifuze MPW-51 (Mechanika Precyzyjna, Polsko) při 17 900 x g.

1. Pomocí špičky byla bílá kolonie zaočkována do 2 ml LB média a kultivována přes noc v inkubátoru NB205-QF (N-Biotek, Korea) při 37 °C a 250 x rpm.
2. Médium s buňkami bylo přeneseno do 1,5 ml centrifugačních zkumavek a sesbíráno 3 minutovou centrifugací při 6 800 x g.
3. Peleta byla resuspendována v 250 µl pufru P1.
4. K resuspendované peletě bylo přidáno 250 µl lyzačního pufru P2 a směs byla promíchána. Inkubace v lyzačním pufru by neměla překročit 5 minut.
5. Pro zastavení lyzační reakce bylo přidáno 350 µl pufru N3, směs byla promíchána a odstředěna po dobu 10 minut.

6. Supernatant z předchozího kroku byl přenesen do QIAprep kolonky, odstředěn po dobu 60 sekund a frakce, která protekla, byla vylita
7. Na kolonku bylo přidáno 500 µl pufru PB, kolonka byla centrifugována po dobu 60 sekund a frakce, která protekla, byla vylita.
8. Na kolonku bylo naneseno 750 µl pufru PE a kolonka byla odstředěna.
9. Kolonka byla vložena do nové sběrné zkumavky a znovu odstředěna.
10. Kolonka byla vložena do 1,5 ml centrifugační zkumavky a pro eluci DNA na ni bylo naneseno 50 µl EB pufru.
11. Kolonka s EB pufrem byla 1 minutu inkubována a odstředěna.

Tabulka 4.10: Teplotní program pro Colony PCR

krok	teplota	čas	počet cyklů
počáteční denaturace	94 °C	5 min	
denaturace	94 °C	10 s	40
hybridizace	51 °C	30 s	40
elongace	72 °C	45 s	40
závěrečná inkubace	72 °C	10 min	

4.2.2.9 Sekvenace

Vzorky byly sekvenovány firmou Macrogen v Korei. Pozitivní ověřené kolonie byly špičkou přeneseny na 1% LB agar ampicilinem (0,1 mg/l), který byl rozpipetován po 100 µl do jednotlivých jamek v 96 jamkové mikrotitrační destičce. Sekvence byly následně zarovnány pomocí programu BioEdit, byly určeny QAP alely *DQA1* a alely *DQB1* a provedena methylační analýza.

4.2.3 Metody zpracování RNA

Míra exprese genu *HLA* na úrovni mRNA byla měřena pomocí Real – Time PCR. Po odebrání plné periferní krve dárců byla izolována RNA, která byla poté přepsána do cDNA. Následně byl pomocí kvantitativní PCR určen poměr exprese jednotlivých alel dárce.

4.2.3.1 Izolace RNA

RNA byla izolována z plné krve pomocí kitu QIAamp® RNA Blood Mini Kit (QIAGEN, USA), dle postupu doporučeného výrobcem. Všechny centrifugací kroky probíhaly při 4 °C.

1. 1,5 ml plné krve bylo smícháno se 7,5 ml pufru EL a tato směs byla inkubována 10-15 min na ledu.
2. Po inkubaci byly buňky sesbírány desetiminutovou centrifugací při 400 x g.
3. K peletám byly přidány 3 ml pufru EL, pelety byly resuspendovány a zopakován krok 2.
4. K peletám leukocytů bylo přidáno 600 µl pufru RLT, lyzát byl napipetován na QIAshredder kolonku a odstředěn 2 minuty při 17 900 x g.
5. K homogenizovanému lyzátu bylo přidáno 600 µl 70% ethanolu, 700 µl směsi bylo přepipetováno na QIAamp kolonku a směs byla odstředěna při 8 000 x g po dobu 15 s.
6. Na QIAamp kolonku byla nanесena zbylá směs a opět odstředěna.
7. Kolonka byla přenesena do nové sběrné zkumavky, bylo na ni nanесeno 700 µl RW1 pufru a kolonka byla odstředěna.
8. Kolonka byla přenesena do nové sběrné zkumavky, bylo na ni nanесeno 500 µl RPE pufru a kolonka byla odstředěna.
9. Kolonka byla přenesena do nové sběrné zkumavky, bylo na ni nanесeno 500 µl RPE pufru a kolonka byla odstředěna 3 minuty při 17 900 x g.
10. Kolonka byla přenesena do nové sběrné zkumavky a odstředěna při 17 900 x g po dobu 1 minuty
11. Kolonka byla přenesena do 1,5 ml zkumavky, bylo na ni nanесeno 40 µl dH₂O a směs byla odstředěna při 8 000 x g po dobu 1 minuty
12. Předchozí krok byl zopakován.
13. Podle uvedeného postupu byla získána purifikovaná RNA jejíž koncentrace byla změřena na nanofotometru (Implen, Německo).

4.2.3.2 Reverzní transkripce

Za účelem získání cDNA byla provedena reverzní transkripce mRNA pomocí High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA), dle doporučení výrobce. Všechny kroky probíhaly na ledu v laminárním boxu Lauramini (BioAir, Italy).

1. Podle tabulky 4.11 byla připravena reakční směs, ke směsi bylo přidáno 200 ng RNA a objem byl doplněn do 20 μ l dH₂O.
3. Směs byla vložena do termocykleru LabCycler gradient SensoQuest (Scholler, Německo) nebo C1000TM (Biorad, USA), kde byl nastaven teplotní program uvedený v tabulce 4.12.
4. Po dokončení reakce byla směs uchovávána při -20 °C.

Tabulka 4.11: Složení reakční směsi pro jednu reverzní transkripci

složka	objem
dH ₂ O	4,2 μ l
10x RT pufr	2,0 μ l
25x dNTP mix	0,8 μ l
10x RT primery	2,0 μ l
MultiScribe reverzní transkriptáza	1,0 μ l

Tabulka 4.12: Teplotní program pro reverzní transkripci

krok	teplota	čas
hybridizace	25 °C	10 min
reverzní transkripce	37 °C	120 min
inaktivace enzymu	85 °C	5 min

4.2.3.3 Kvantitativní PCR

Kvantitativní PCR umožňuje zaznamenání příbytku produktu v reálném čase, po každém proběhnutém cyklu. V této práci byly použity fluorescenční sondy TaqMan, které se obsahují fluorofores na 5' konci, oligonukleotidovou sekvencí komplementární k části sledovaného úseku DNA a zhášec fluorescencí na 3' konci. Pokud se fluorofores nachází blízko zhášec, zhášec tlumí světlo emitované fluoroforem. Pokud je však úsek během cyklu amplifikován DNA polymerázou, její 5'-3' exonukleázová aktivita degraduje sondu, což umožní vzdálení zhášec od fluorofores a tím jeho fluorescenci. Na základě dřívějších pokusů byl jako endogenní kontrola

použit gen pro PPIA (Applied Biosystems, USA). Všechny přípravné kroky probíhaly na ledu, reakce byly připravovány v tripletech.

1. cDNA byla 10x naředěna vodou
2. Reakční směs byla připravena podle hodnot uvedených v tabulce 4.13. Reakční směs pro gen *PPIA* byla připravena podle tabulky 4.14.
4. Reakční směs byla rozpipetována po 7,5 µl do 96 jamkové destičky.
5. K reakční směsi bylo přidáno 5 µl DNA.
6. Destička byla přelepena fólií, odstředěna 2 minuty při 2000 x g. Absolutní kvantifikace byla měřena na přístroji 700 SDS ABI Prism (Applied Biosystem, USA), kde byl nastaven program uvedený v tabulce 4.15.

Tabulka 4.13: Složení reakční směsi pro jednu kvantitativní PCR

složka	objem
Gene Expression Master Mix	6,250 µl
Přímý primer (5 µM)	0,375 µl
Zpětný primer (5 µM)	0,375 µl
Sonda (5 µM)	0,500 µl

Tabulka 4.14: Složení reakční směsi pro kvantitativní PCR genu *PPIA*.

Složka	objem
Gene Expression Master Mix	6,250 µl
PPIA Assay	0,625 µl
dH ₂ O	0,625 µl

Tabulka 4.15: Teplotní program pro kvantitativní PCR

krok	teplota	čas	počet cyklů
aktivace UNG	50 °C	2 min	
aktivace polymerázy	95 °C	10 min	
denaturace	95 °C	15 s	50
hybridizace a elongace	60 °C	1 min	50

4.2.4 Statistická analýza

Výsledky byly statisticky zpracovány pomocí programu GraphPad Prism 5.04. Pro porovnání celkové methylace jednotlivých alel QAP a *DQB1* byl použit Mann-Whitneyho neparametrický test s hladinou významnosti $\alpha=0,05$, tento test byl použit také pro srovnání relativní exprese alel QAP. Pro porovnání methylačního stavu jednotlivých CpG míst byl použit exaktní Fischerův dvoustranný test s hladinou významnosti $\alpha=0,05$. Asociace relativní exprese a celkové methylace QAP alel byla analyzována pomocí korelačního testu s Pearsonovým koeficientem.

5. VÝSLEDKY

5.1 Genotypizace HLA molekul

U všech dárců krve byla provedena genotypizace polymorfizmů HLA genů II. třídy *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1* a *HLA-DRB1*. Četnosti haplotypů pro jednotlivé věkové skupiny jsou zobrazeny v tabulce 5.1, z tohoto souboru bylo vybráno 17 dětí, 30 studentů a 15 seniorů pro další analýzu. Nejvíce je zastoupený haplotyp *DRB1*11 – DQA1*0505 – DQB1*0301*, dále pak v závislosti na skupině *DRB1*15 – DQA1*0102 – DQB1*0602* u dětí, *DRB1*01 – DQA1*0101 – DQB1*0501* u studentů a *DRB1*07 – DQA1*0201 – DQB1*0202* ve skupině seniorů.

Tabulka 5.1: Výsledky genotypizace HLA genu. Tabulka znázorňuje frekvence v % a četnosti (N) haplotypů pro jednotlivé věkové skupiny Celkově bylo detekováno 28 odlišných haplotypů (včetně 9 neklasických).

Genotyp			frekvence (N) 5-10 let	frekvence (N) 24-30 let	frekvence (N) 60-77 let
DRA	DQA1	DQB1			
11	0505	0301	23,5% (8)	17,1% (14)	13,3% (4)
15	0102	0602	20,6% (7)	8,5% (7)	6,7% (2)
01	0101	0501	8,8% (3)	11% (9)	3,3% (1)
12	0505	0301	8,8% (3)	1,2% (1)	6,7% (2)
03	0501	0201	5,9% (2)	8,5% (7)	6,7% (2)
13	0103	0603	5,9% (2)	7,3% (6)	6,7% (2)
14	0104	0503	5,9% (2)	3,7% (3)	6,7% (2)
07	0201	0303	5,9% (2)	0% (0)	3,3% (1)
04	0301	0302	2,9% (1)	7,3% (6)	10% (3)
11	0102	0502	2,9% (1)	0% (0)	0%(0)
10	0105	0501	2,9% (1)	0% (0)	0% (0)
07	0201	0202	0% (0)	8,5% (7)	13,3% (4)
08	0401	0402	0% (0)	7,3% (6)	0% (0)
13	0102	0604	0% (0)	6,1% (5)	6,7% (2)
04	0302	0202	0% (0)	3,7% (3)	0% (0)
13	0102	0609	0% (0)	2,4% (2)	0% (0)
16	0102	0502	0% (0)	1,2% (1)	0(0)
11	0103	0603	0% (0)	1,2% (1)	0% (0)
04	0303	0301	0% (0)	0% (0)	6,7% (2)
neklasické haplotypy			5,9% (2)	4,7% (4)	10% (3)

5.2 Analýza methylačního stavu promotoru genu *DQA1*

Na základě nukleotidové sekvence byla provedena analýza a identifikace CpG ostrůvků v promotorové oblasti genu *DOAI*, viz příloha 1. Celkově bylo na sekvenaci odesláno 252 vzorků. Část vzorků však byla ze souboru vyloučena z důvodu rekombinace alel, která byla popsána Meyerhansem *et al.* (1990) a dále byly vyloučeny také vzorky, u kterých hodnota bisulfitové konverze byla menší než 95 %. Analýze bylo podrobena 160 vzorků, z toho 33 vzorků pocházelo od dětí, 95 od studentů a 32 od seniorů. Pomocí nested PCR byl namnožen promotorový úsek nacházející se ve vzdálenosti -670 až -126 nukleotidů od start kodónu (545 bp dlouhý). V průběhu práce se však v laboratoři objevila mikrobiální kontaminace, která byla nespecificky amplifikována pomocí primerů pro amplifikaci tohoto úseku, proto byly pro dokončení práce použity primery *DQA1*-k (viz kapitola 4.1) amplifikující úsek nacházející se ve vzdálenosti -590 až -162 nukleotidů od start kodónu (429 bp dlouhý). Touto amplifikací však byla ztracena některá methylační místa a také nebylo možno amplifikovat alely QAP 4.1A a 4.1B. Získaná data poskytla informace jak celkové metylaci QAP alel, tak i o metylaci jednotlivých CpG míst alel QAP.

5.2.1 Určení alel promotoru genu *DQA1*

Na základě sekvenačních dat byly pomocí polymorfismů nacházejících se v pozicích -562 až -191 určeny promotorové alely genu *DQA1*. Sekvence QAP alel jednotlivých vzorků a věkových skupin se nachází v příloze 2. Data vyznačená tučně byla použita z nepublikovaného výzkumu laboratoře. Vzorky dárců ve věku 5-10 let jsou značeny počátečním písmenem D, vzorky dárců ve věku 24-30 let počátečním písmenem S a vzorky dárců ve věku 60-77 let písmenem P. Na základě nově nalezených polymorfismů v sekvenované oblasti byla alela QAP 1.2 dle Brännlera *et al.* (1997) rozdělena na 2 alely QAP 1.2K a 1.2L, a alela QAP 4.1 na alely 4.1A a 4.1B. Promotory přiřazené jednotlivým alelám jsou zobrazeny v tabulce 5.2. Protože po bisulfitové konverzi byl smazán rozdíl mezi cytosiny a thyminy, nebylo možno rozlišit promotorové alely QAP 1.1 a QAP 1.5. Protože je však frekvence alely QAP 1.1 v populaci mnohem vyšší než frekvence alely QAP 1.5 a mezi námi získanými sekvencemi nebyly nalezeny rozdíly, je tato alela dále značená jako QAP 1.1.

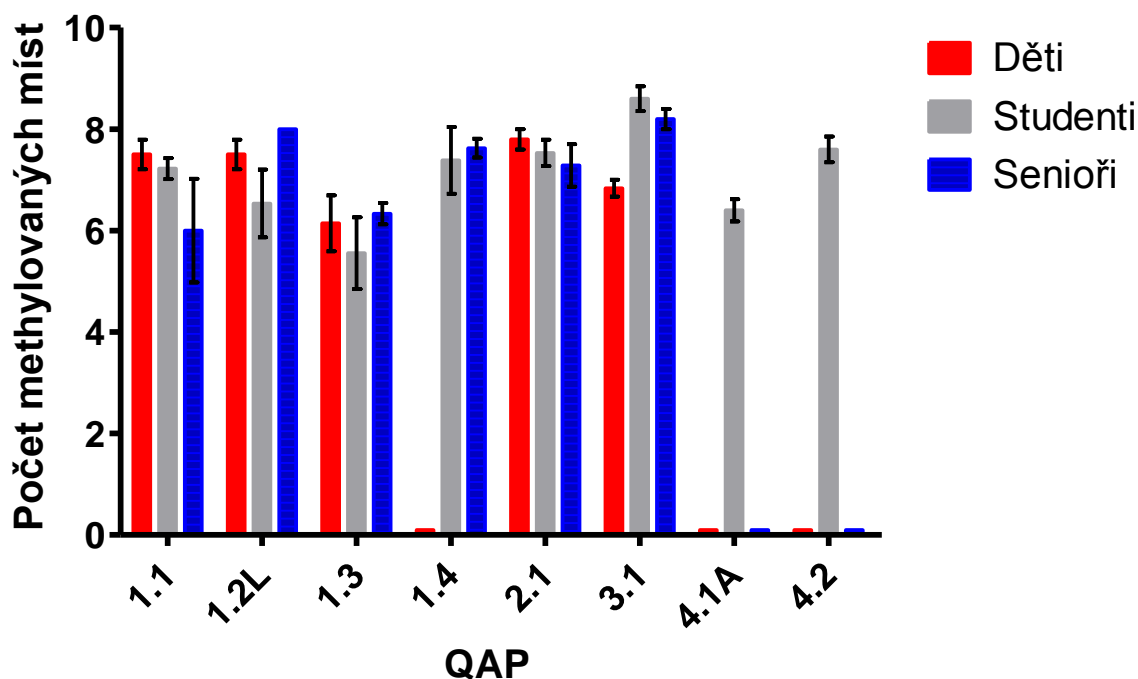
Tabulka 5.2: Promotorové alely QAP jako součásti jednotlivých haplotypů. Porovnáním sekvenčních dat s polymorfními místy promotorového úseku byly určeny jednotlivé alely promotoru *DQAI* (QAP).

Genotyp			promotor
DRA	DQAI	DQBI	QAP
01	0101	0501	1.1
15	0102	0602	1.2L
16	0102	0502	1.2K
13	0103	0603	1.3
14	0104	0503	1.3
11	0103	0603	1.3
13	0102	0604	1.4
13	0102	0609	1.4
07	0201	0303	2.1
07	0201	0202	2.1
10	0201	0202	2.1
04	0301	0302	3.1
11	0505	0301	4.1A
03	0501	0201	4.1B
08	0401	0402	4.2

5.2.2 Porovnání celkového methylačního stavu jednotlivých QAP alel

Rozdíly v stavu celkové methylace mezi jednotlivými alelami byly určeny porovnáním počtu všech methylovaných CpG míst v oblasti -562 až -192 u jednotlivých alel. Data byla porovnána neparametrickým Mann-Whitneyho testem s hladinou významnosti $\alpha=0,05$. Zjištěné hodnoty p byly korigovány na mnohočetná porovnání Bonferroniho korekcí vynásobením počtem porovnávaných věkových skupin (v případě porovnání stavu methylace QAP alel mezi generacemi) nebo počtem porovnávaných alel QAP (v případě porovnávání stavu methylace QAP alel mezi sebou v rámci jedné generace). Graf 5.1 zobrazuje porovnání celkové methylace alel QAP mezi generacemi a také mezi jednotlivými QAP pro každou generaci. Hodnoty p pro jednotlivá porovnání jsou zobrazeny v tabulce 5.3, hodnoty p nižší než 0,05 jsou vyznačeny tučným písmem. Hodnoty, které se ukázaly statisticky významné i po korekci jsou podbarveny šedým pozadím. Nepodařilo se nalézt statisticky významný rozdíl v celkové methylaci jednotlivých QAP alel mezi generacemi, avšak podařilo se nalézt statisticky významné rozdíly mezi QAP alelami v rámci jednotlivých věkových skupin. QAP alela 1.3 je u vzorků studentů methylována méně než QAP alely 1.1 ($p_{kor}=0,014$), QAP 1.4 ($p_{kor}=0,015$), QAP 2.1 ($p_{kor}=0,007$),

QAP 3.1 ($p_{kor}=0,018$) a QAP 4.2 ($p_{kor}=0,011$). Také QAP alela 4.1A je methylována méně než alely QAP 1.4 ($p_{kor}=0,034$), QAP 2.1 ($p_{kor}=0,012$), QAP 3.1 ($p_{kor}=0,016$) a QAP 4.2 ($p_{kor}=0,045$). Další statisticky významný rozdíl byl nalezen pro alelu QAP 3.1, která je methylována ve větší míře než alely QAP 1.1 ($p_{kor}=0,0352$) a QAP 2.1 ($p_{kor}=0,048$). Statisticky významný je také rozdíl v celkové methylaci alely QAP 1.3 u vzorků seniorů, která je methylována méně než alely QAP 1.4 ($p_{kor}=0,031$) a QAP 3.1 ($p_{kor}=0,031$). Statistický rozdíl ve skupině seniorů byl nalezen také mezi alelami QAP 1.1 a QAP 3.1, přičemž alela QAP 1.1 je methylována méně ($p_{kor}=0,05$).



Graf 5.1: Porovnání celkové methylace QAP alel mezi generacemi a mezi jednotlivými alelami. Graf dokumentuje rozdíly v celkové methylaci QAP alel. Nejvíce methylované jsou alely QAP 1.4, 2.1 a 3.1 a 4.2. Mezi nejméně methylované alely QAP patří 1.3.

Tabulka 5.3: Porovnání celkové methylace alel QAP. Znáznorněny jsou hodnoty p před korekcí pro jednotlivé kombinace QAP alel. Tučným písmem jsou vyznačeny hodnoty p menší než 0,05. Hodnoty, které byly statisticky významné i po korekci jsou podbarveny šedým pozadím.

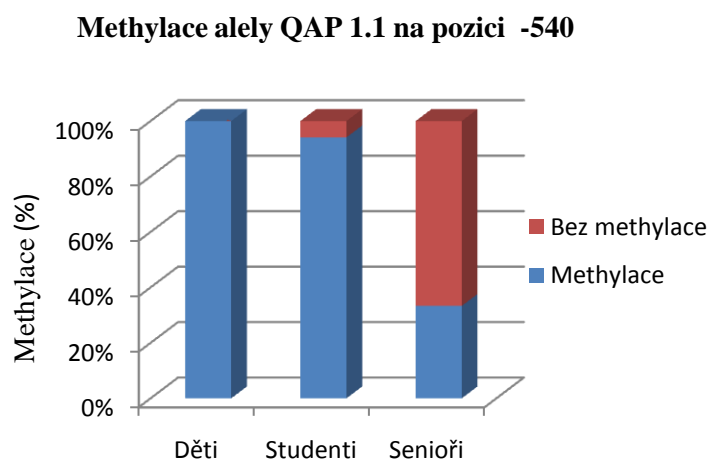
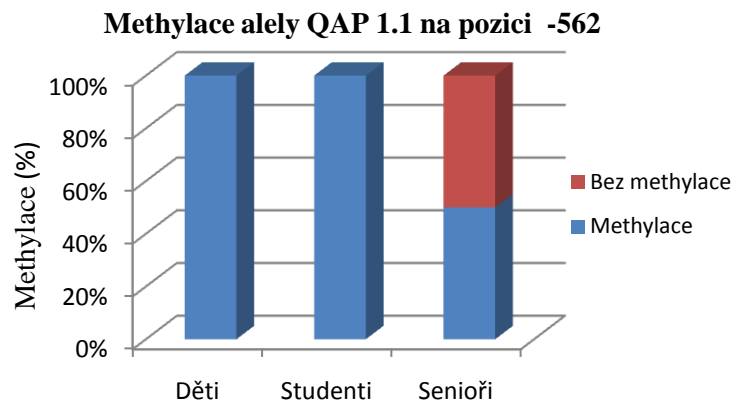
		děti					studenti								senioři					průměrná methylace
		1.1	1.2L	1.3	2.1	4.1A	1.1	1.2L	1.3	1.4	2.1	3.1	4.1A	4.2	1.1	1.3	1.4	2.1	3.1	
děti	1.1	x	0,882	0,05	0,456	0,088	0,538	x	x	x	x	x	x	x	0,176	x	x	x	x	7,67
	1.2L		x	0,028	0,692	0,117	x	0,55	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	7,36
	1.3			x	0,011	0,333	x	x	0,294	x	x	x	x	x	x	0,691	x	x	x	6,00
	2.1				x	0,017	x	x	x	x	0,831	x	x	x	x	x	x	0,435	x	7,75
	4.1A					x	x	x	x	x	x	x	0,204	x	x	x	x	x	x	6,80
studenti	1.1						x	0,51	0,002	0,1	0,066	0,004	0,012	0,288	0,214	x	x	x	x	7,18
	1.2L							x	0,038	0,311	0,404	0,008	0,069	0,578	x	x	x	x	x	6,43
	1.3								x	0,002	0,001	0,002	0,296	0,001	x	0,522	x	x	x	5,50
	1.4									x	0,609	0,147	0,004	0,564	x	x	0,562	x	x	7,25
	2.1										x	0,006	0,002	0,818	x	x	x	0,428	x	7,50
	3.1											x	0,002	0,052	x	x	x	x	0,27	8,50
	4.1A												x	0,006	x	x	x	x	x	6,56
	4.2													x	x	x	x	x	x	7,54
senioři	1.1														x	0,314	0,043	0,173	0,01	5,83
	1.3															x	0,006	0,066	0,007	5,50
	1.4																x	0,738	0,089	7,25
	2.1																	x	0,081	7,33
	3.1																		x	8,33
průměrná methylace		7,67	7,36	6,00	7,75	6,80	7,18	6,43	5,50	7,25	7,50	8,50	6,56	7,54	5,83	5,50	7,25	7,33	8,33	

5.2.3 Porovnání methylačního stavu jednotlivých CpG míst QAP alel

Rozdíl methylačního stavu jednotlivých CpG míst byl určen porovnáním Fischerovým exaktním testem s hladinou významnosti $\alpha=0,05$ a data byla následně korigována stejným způsobem jako v kapitole 5.2.2. Hodnoty p pro porovnání methylace QAP alel mezi generacemi se nachází v příloze 5. Statisticky významný rozdíl byl po korekci nalezen v pozicích -562 a -540 (viz tabulka 5.4), ve kterých byla alela QAP 1.1 u vzorků studentů methylována ve větší míře, než u vzorků straších lidí ($p_{kor}=0,034$, 95% CI=1,458-840,3 pro pozici -562 a $p_{kor}=0,023$, 95% CI=2,285-448,1 pro pozici -540). Tato dvě místa jsou v příloze 1 podbarvena modrým pozadím. V grafu 5.2 jsou pro tato dvě místa zobrazena porovnání četnosti methylovaných míst mezi generacemi a mezi jednotlivými QAP alelami. Hladině významnosti se blížil také rozdíl v methylaci pozice -508, ve které se zdála být alela QAP 1.2L více methylována u vzorků dětí, než u vzorků studentů ($p_{kor}=0,051$). Interval spolehlivosti však obsahoval číslo 1 (95% CI=0,8879-362,8) a nebylo tak možno vyloučit možnost náhodného nálezu. Porovnány byly také rozdíly v methylaci jednotlivých CpG míst mezi QAP alelami pro každou generaci. Výsledky pro skupinu dětí jsou zobrazeny v příloze 6, pro skupinu studentů v příloze 7 a pro skupinu seniorů v příloze 8, statisticky významné hodnoty spolehlivosti před korekcí jsou zvýrazněny tučně. Po korekci se však žádný z těchto rozdílů neukázal statisticky významný.

Tabulka 5.4: Statisticky významné rozdíly v methylaci jednotlivých CpG míst

QAP alely	CpG místo	p po korekci	95% CI
S1.1xP1.1	-562	0,034	1,458-840,3
S1.1xP1.1	-540	0,023	2,285-448,1



Graf 5.2: Porovnání četnosti methylace alely QAP 1.1 mezi generacemi pro CpG nacházející se v pozicích -562 a -540 od počátku transkripce.

5.3 Analýza relativní úrovně exprese mRNA genu *DQA1*

Celková RNA získaná od dárců byla přepsána do cDNA a množství specifických mRNA bylo kvantifikováno pomocí real-time PCR. Všechny reakce byly připraveny v triplikátech, proto pro každý vzorek byly získány 3 hodnoty Ct (PCR cyklus, v němž fluorescence amplifikovaného templátu překročí bazální fluorescenci) pro každou alelu genu *DQA1*, pro gen *DQA1* bez ohledu na jeho genotyp/bez ohledu na přítomné alely, pro gen *DRA* a pro gen *PPIA*. Z těchto hodnot jsme vypočítali průměrné Ct pro daný vzorek. Expresi jednotlivých alel genu *DQA1* byla vztažena k expresi molekuly *DRA*, vzorec pro výpočet je následující:

$$\frac{n_{DQA1}}{n_{DRA}} = \frac{2^{CtDRA}}{(1+U)^{CtDQA1}},$$

kde n značí množství PCR produktu, U je účinnost, která byla pro jednotlivé alely zjišťována pomocí hodnot získaných od homozygotů. Účinnosti celkové amplifikace genu *DQA1* (*DQA1* total) a genu *DRA* byly považovány za rovny 1. Kromě primerů amplifikujících jednotlivé alely, byly použity také primery amplifikující všechny *DQA1* alely (*DQA1* total). Součet relativní exprese jednotlivých *DQA1* alel každého vzorku byl následně porovnán s hodnotou relativní exprese pro celkové *DQA1* ve vzorku. Pokud se tyto dvě hodnoty lišily o více než 15 % (tj. kontrolní poměr byl mimo interval <0,85; 1,15>), byl vzorek ze statistického souboru vyřazen. Kontrolní poměr byl vypočten pomocí vzorce:

$$\frac{\sum n_{DQA1t}}{n_{DQA1t}} = \frac{2^{CtDQA1t}}{(1+U_1)^{CtDQA1_1}} + \frac{2^{CtDQA1t}}{(1+U_2)^{CtDQA1_2}},$$

kde *DQA1t* značí *DQA1* total. Příklad výpočtu těchto hodnot je zobrazen v tabulce 5.5. Data získaná pro vzorky studentů pocházejí z nepublikovaného výzkumu laboratoře.

Tabulka 5.5: Příklad úpravy dat získaných pro heterozygoty s alelami *DQA1**01 a *03.

gen pro	<i>DQA1</i> *01	<i>DQA1</i> *03	<i>DQA1</i> total	<i>DRA</i>	<i>nDQA1</i> *01/ <i>nDRA</i>	<i>nDQA1</i> *03/ <i>nDRA</i>	<i>nDQA1</i> total/ <i>nDRA</i>	kontrolní poměr
vzorek	průměr Ct	průměr Ct	průměr Ct	průměr Ct				
S11	26,050	26,600	25,200	22,840	0,083	0,103	0,195	0,957
P9	27,443	27,401	26,330	25,495	0,197	0,377	0,561	1,023
P13	25,964	25,623	24,650	24,330	0,249	0,563	0,801	1,013

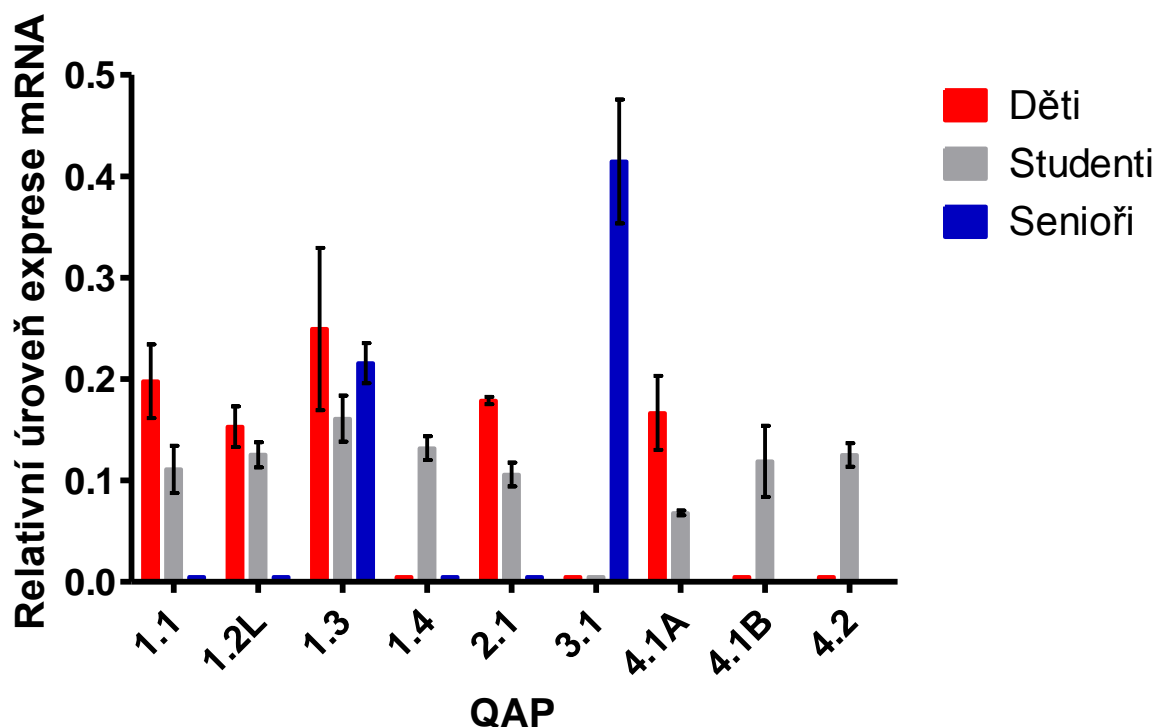
5.3.1 Srovnání rozdílů relativní úrovně exprese mRNA jednotlivých alel asociovaných s QAP promotory

Expres jednotlivých alel genu *DQA1* byla vztažena k expresi molekuly *DRA*. Rozdíly v expresi různých alel v rámci věkových skupin i rozdíly v expresi stejné alely mezi jedinci různých věkových skupin byly porovnány pomocí neparametrického Mann-Whitneyho testu s hladinou významnosti $\alpha=0,05$ a statisticky významné rozdíly byly korigovány počtem porovnávaných QAP alel. Výsledky jsou zobrazeny v tabulce 5.6, průměrná relativní exprese jednotlivých alel asociovaných s QAP promotory, vztažená k expresi *DRA*, je zobrazena v grafu 5.3. Statisticky významné rozdíly byly nalezeny pro alely asociované s promotorem QAP 4.1A,

jejichž relativní úroveň exprese mRNA je nižší než u alel asociovaných s promotory QAP 1.2L ($p_{kor}=0,008$), QAP 1.3 ($p_{kor}=0,018$), QAP 2.1 ($p_{kor}=0,002$) a QAP 4.2 (0,043). Při porovnání relativní úrovně exprese mRNA mezi generacemi se statisticky významný ukázal rozdíl mezi alelami asociovanými s promotorem QAP 4.1A, jejichž úroveň exprese je nižší u věkové skupiny studentů než u věkové skupiny dětí ($p_{kor}=0,05$).

Tabulka 5.6: Rozdíly v relativní úrovni exprese alel genu *DQA1*. Hodnoty p před korekcí pro jednotlivá porovnání relativní úrovně exprese mezi generacemi a mezi jednotlivými alelami asociovanými s QAP promotory.

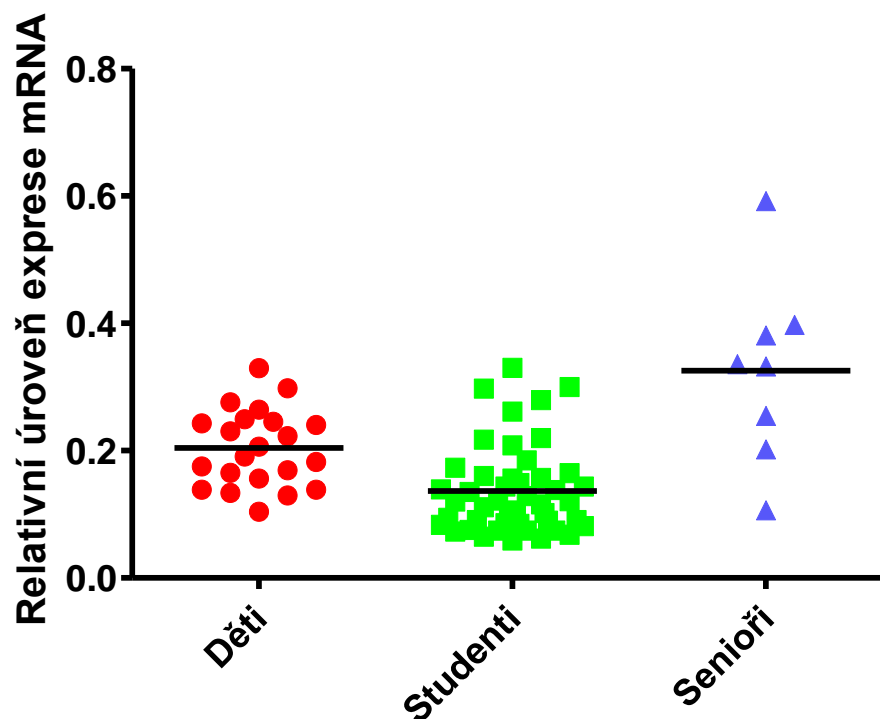
		děti			studenti							senioři		relativní úroveň exprese
		1.1	1.2L	4.1A	1.1	1.2L	1.3	2.1	4.1A	4.1B	4.2	1.3	3.1	
děti	1.1	x	0,476	0,7	0,2	x	x	x	x	x	x	x	x	0,198
	1.2L		x	0,857	x	0,352	x	x	x	x	x	x	x	0,153
	4.1A			x	x	x	x	x	0,017	x	x	x	x	0,167
studenti	1.1				x	0,548	0,143	0,833	0,017	0,857	0,629	x	x	0,111
	1.2L					x	0,329	0,234	0,001	0,476	0,914	x	x	0,125
	1.3						x	0,048	0,003	0,286	0,413	0,294	x	0,161
	2.1							x	0,000	0,788	0,315	x	x	0,106
	4.1A								x	0,012	0,006	x	x	0,068
	4.1B									x	0,343	x	x	0,119
	4.2										x	x	x	0,125
starší lidé	1.3											x	0,057	0,216
	3.1												x	0,415
relativní úroveň exprese		0,198	0,153	0,167	0,111	0,125	0,161	0,106	0,068	0,119	0,125	0,216	0,415	



Graf 5.3: Průměrná relativní úroveň exprese mRNA *DQA1* alel asociovaných s jednotlivými QAP promotory (vztaheno k expresi mRNA genu *DRA*).

5.3.2 Korelace relativní úrovně exprese mRNA genu *DQA1* a methylačního stavu promotoru QAP

Relativní exprese alel jednotlivých vzorků vztahená k expresi *DRA* a průměrná celková methylace alel jednotlivých vzorků byly podrobeny korelační analýze s Pearsonovým korelačním koeficientem. Nepodařilo se však prokázat statisticky významnou korelaci těchto veličin. Graf 5.4 zobrazuje relativní úroveň exprese alel genu *DQA1* jednotlivých vzorků rozdělených podle věkových skupin. Z grafu je možno vyčíst, že průměrná relativní úroveň exprese mRNA *DQA1* u studentů je nižší než u dětí ($p < 0,001$). Protože pro věkovou skupinu seniorů byl získán menší počet hodnot, jsou tato data neprůkazná a úroveň míry exprese této skupiny nelze srovnávat s ostatními skupinami.



Graf 5.4: Porovnání relativní úrovně exprese mRNA jednotlivých vzorků. Seřazeno podle věkových skupin

5.4 Analýza methylačního stavu regulační oblasti genu *DQB1*

Izolovaná DNA byla konvertována bisulfitovou konverzí a následně byla amplifikována regulační oblast genu *DQB1* obsahující CpG ostrov. Amplifikovaná oblast překrývala intron 1, exon 1 a intron 2. Protože je úsek příliš velký, byl rozdělen na dvě části. V první oblasti byly analyzovány pozice nacházející se 1087 až 1728 nukleotidů od začátku transkripce (úsek A), ve druhé oblasti pozice nacházející se 1762 až 2004 nukleotidů od začátku transkripce (úsek B). Navržené primery amplifikovaly alely *DQB1**05, *DQB1**06, avšak nebylo s nimi možné amplifikovat alely *DQB1**02, *DQB1**03 *DQB1**04. Na sekvenaci bylo zasláno celkem 49 sekvencí úseku A a 57 sekvencí úseku B, po vyřazení rekombinovaných alel a sekvencí s úspěšností konverze nižší než 95 % bylo 12 sekvencí z úseku A a 34 sekvencí z úseku B podrobeno statistické analýze. Polohu a methylační stav CpG míst těchto sekvencí je možno nalézt v přílohách 3 (úsek A) a 4 (úsek B).

5.4.1 Porovnání celkového methylačního stavu regulační oblasti jednotlivých alel genu *DQB1*

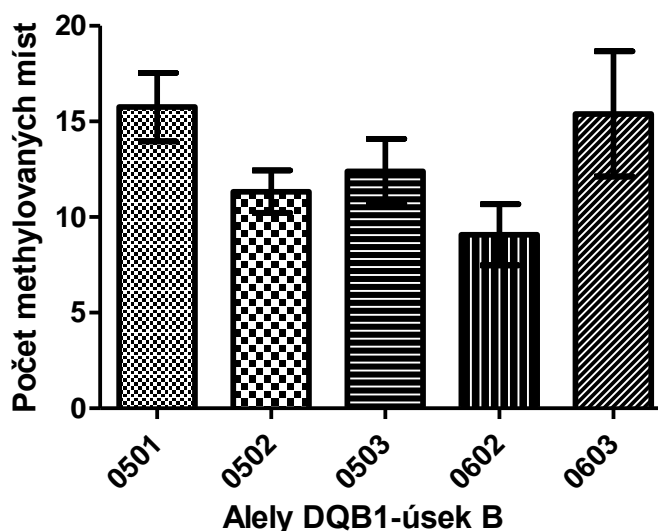
Rozdíl celkového methylačního stavu alel byl určen porovnáním methylace v oblasti 1087 až 1728 nukleotidů od start kodónu pro úsek A a v oblasti 1762 až 2004 nukleotidů od start kodónu pro úsek B. Data byla porovnána Mann-Whitneyho neparametrickým testem s hladinou významnosti $\alpha=0,05$. V úseku A byly analyzovány alely *DQB1**0502, *DQB1**0503 a *DQB1**0603, avšak nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v methylaci těchto alel. V úseku B byly analyzovány alely *DQB1**0501, *DQB1**0502, *DQB1**0503, *DQB1**0602 a *DQB1**0603. Statisticky významný rozdíl byl nalezen mezi alelami *DQB1**0501 a *DQB1**0602, přičemž alela *DQB1**0501 je methylována více než alela *DQB1**0602. Po korekci však hodnota p_{kor} byla vyšší než 0,05 a rozdíl tedy prokázán nebyl. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 5.7 a v tabulce 5.8, v grafu 5.5 je porovnán průměrný počet methylovaných míst jednotlivých alel pro úsek B.

Tabulka 5.7: Srovnání celkové methylace jednotlivých *DQB1* alel v úseku A.

	0501	0503	0602	průměrná methylace
0501	x	0,90	1,00	3,0
0503		x	0,43	2,6
0602			x	2,0
průměrná methylace	3,0	2,6	2,0	

Tabulka 5.8: Srovnání celkové methylace jednotlivých *DQB1* alel v úseku B.

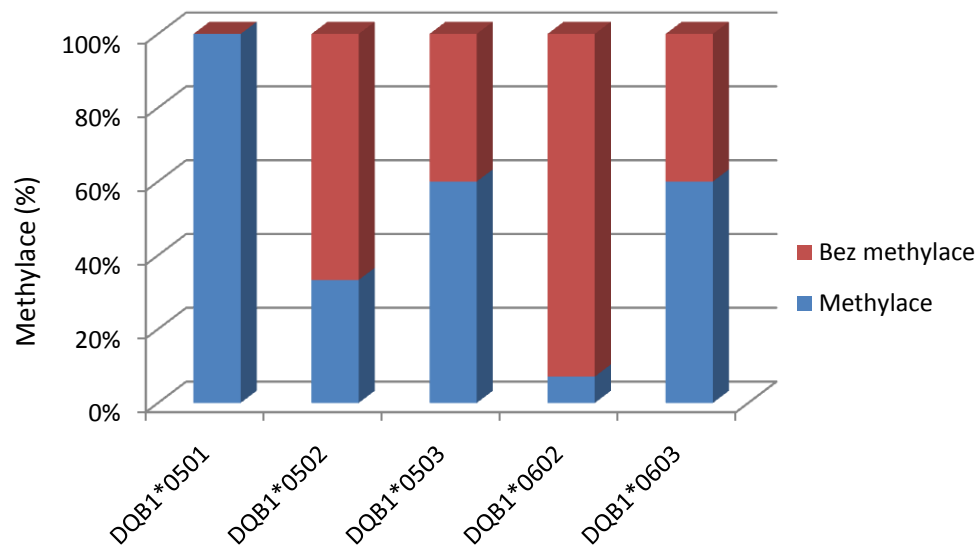
	0501	0502	0503	0602	0603	průměrná methylace
0501	x	0,108	0,171	0,049	1	15,8
0502		x	0,782	0,228	0,455	11,3
0503			x	0,194	0,53	12,4
0602				x	0,114	9,1
0603					x	15,4
průměrná methylace	15,8	11,3	12,4	9,1	15,4	



Graf 5.5: Porovnání průměrného počtu methylovaných míst v regulační oblasti genu *DQB1*, úseku B pro jednotlivé alely.

5.4.2 Porovnání methylačního stavu jednotlivých CpG míst v oblasti intronu 1

Protože úsek intronu 1 a exonu 1 byl velmi málo methylován a téměř veškerá methylace se nacházela v oblasti intronu 2, byla porovnána methylace jednotlivých CpG míst v této oblasti. V příloze 9 jsou zobrazeny hodnoty p pro jednotlivá porovnání před korekcí. Hodnoty p menší než 0,05 jsou vyznačeny tučně. Tyto hodnoty byly podrobeny korekci vynásobením počtem porovnávaných alel. Hodnoty, které byly nižší než 0,05 i po korekci jsou podbarveny šedě. Statisticky významný rozdíl byl nalezen v pozici 2235 nukleotidů od počátku transkripce, kde alela *DQB1**0602 je methylována v menší míře než alela *DQB1**0501 ($p_{\text{kor}}=0,008$, 95% CI= 2.773-2366). Porovnání četnosti methylace jednotlivých CpG míst v této pozici pro alely *DQB1* je zobrazeno v grafu 5.6.



Graf 5.6: Porovnání četnosti methylace CpG místa v pozici 2235 nukleotidů od počátku transkripce, v intronu 2 genu *DQB1*. Statisticky významný rozdíl byl nalezen mezi alelami *DQB1*0602* a *DQB1*0501*, přičemž alela *DQB1*0501* je methylována více.

6. DISKUZE

Regulace exprese HLA molekul II. třídy je klíčovým faktorem, který ovlivňuje imunitní odpověď. V blízkosti počátku transkripce těchto genů se nachází regulační oblasti obsahující CpG místa, jejichž methylační stav umožňuje regulaci transkripce. Methylace těchto míst totiž může znemožňovat vazbu transkripčních faktorů, či označovat místa pro vazbu dalších represivních komplexů a tím ovlivňovat úroveň exprese HLA molekul II. třídy. Protože imunitní odpověď se mění v průběhu života, je pravděpodobné, že úroveň methylace a exprese molekul HLA bude odlišná u různých věkových kategorií. Tato studie proto porovnává methylační stav promotorových alel a úroveň exprese alel genu *DQAI* a *DQBI* mezi třemi věkovými skupinami.

U promotorových alel genu *DQAI* nebyl mezi generacemi nalezen rozdíl v celkové methylaci jednotlivých alel, ale byl nalezen statisticky významný rozdíl v methylaci jednotlivých CpG míst, a to pro alelu QAP 1.1, která byla v místech -562 a -540 methylována více u vzorků studentů než u vzorků seniorů. Nebyl sice nalezen statisticky významný rozdíl v methylaci těchto míst alely QAP 1.1 mezi dětmi a studenty a dětmi a seniory, to však může být způsobeno nízkým počtem analyzovaných sekvencí této alely u vzorků dětí, který může ovlivňovat výsledek Fischerova exaktního testu. Protože se nepodařilo pomocí real-time PCR kvantifikovat míru exprese alely *DQAI*0101* (spojena s promotorem QAP 1.1) u vzorků seniorů, nelze zjistit, zda je úroveň exprese této alely odlišná od úrovně exprese vzorků studentů stejně jako v případě methylace. Podařilo se však prokázat statisticky významný rozdíl v relativní úrovni exprese alel asociovaných s promotorem QAP 4.1A (*DQAI*0505*), která je vyšší u vzorků dětí, než u vzorků dospělých. Tento rozdíl ale na úrovni methylace promotoru nebyl statisticky významný. Z těchto dat vyplývá, že se nepodařilo nalézt souvislost mezi methylací QAP alel a úrovní exprese alel genu *DQAI* s nimi asociovaných. Tento závěr potvrzuje také korelační analýza. Přestože se korelaci nepodařilo prokázat, je možné že výsledek ovlivnilo malé množství analyzovaných vzorků. Je také možné, že tolerance rozdílu relativní exprese jednotlivých *DQAI* alel a celkové exprese *DQAI*, která byla použita jako kontrola, je příliš velká (15 %) a pro další měření by měla být snížena.

Dále byla porovnávána celková methylace QAP alel v jednotlivých věkových skupinách. Statisticky významné rozdíly byly nalezeny ve skupině studentů, ve které byly alely QAP 1.3 a QAP 4.1A methylovány v menší míře než alely QAP 1.4, QAP 2.1, QAP 3.1 a QAP 4.2. Alela QAP 1.3 byla také methylována méně než alela QAP 1.1. Další statisticky významný rozdíl v této

věkové kategorii byl nalezen pro alelu QAP 3.1, která je methylována více než alely QAP 2.1 a QAP 1.1. Zvýšená methylace alely QAP 3.1 (spojena s alelou *DQA1*0301*) je v rozporu s výsledky Brittena *et al.* (2009), kteří identifikovali alelu *DQA1*0301* jako alelu s nejsilnějším promotorem. Tento rozpor může být způsoben odlišnou buněčnou linií zvolenou pro analýzu, odlišnou metodikou nebo tím, že obě studie probíhaly na menším počtu vzorků. Signifikantní rozdíly se ve věkové skupině studentů podařilo prokázat také na úrovni exprese mRNA, kde relativní úroveň exprese alel asociovaných s promotorem QAP 4.1A (*DQA1*0505*) je nižší než u alel asociovaných s promotory QAP 1.2L (*DQA1*0102*), QAP 1.3 (*DQA1*0103*, *DQA1*0104*), QAP 2.1 (*DQA1*0201*) a QAP 4.2 (*DQA1*0401*). Tento rozdíl potvrzují i výsledky Donnera *et al.* (2002), kteří taktéž identifikovali alelu *DQA1*0505* jako alelu s nejnižší relativní úrovní exprese mRNA, avšak jsou v naprostém rozporu s výsledky analýzy methylačního stavu promotoru, podle kterých je alela QAP 4.1A methylována méně než ostatní alely a měla by tedy mít vyšší relativní úroveň exprese mRNA.

Statisticky významný rozdíl v celkové methylaci mezi QAP alelami vzorků seniorů byl nalezen pro alelu QAP 1.3, která je methylována do menší míry než alely QAP 1.4 a QAP 3.1, což odpovídá výsledkům nalezeným pro střední věkovou skupinu. U této věkové skupiny se podařilo prokázat také nižší methylaci QAP alely 1.1 v porovnání s alelou QAP 3.1, stejně jako u vzorků studentů.

U dětí se sice podobný trend prokázat nepodařilo, ale data před korekcí vykazala hodnotu hladiny významnosti menší než 0,05 při porovnání alely QAP 1.3, která byla methylována méně než QAP alely 1.1, 1.2L a 2.1 a dále alely QAP 4.1A, která byla methylována méně než QAP alela 2.1. Protože statistický soubor obsahoval menší počet vzorků, je pravděpodobné, že po jeho rozšíření budou statisticky významné rozdíly objeveny.

Dalším cílem této diplomové práce bylo porovnání celkové methylace jednotlivých alel regulační oblasti genu *DQB1* mezi věkovými kategoriemi. V laboratoři se však vyskytla mikrobiální kontaminace, která se nespecificky amplifikovala stejnými primery jako regulační oblasti genu *DQB1*, nebylo možno práci dokončit a porovnávány jsou pouze jednotlivé alely *DQB1*0501*, *DQB1*0502*, *DQB1*0503*, *DQB1*0602* a *DQB1*0603* pro věkovou kategorii dětí, kde se však nepodařilo nalézt statisticky významný rozdíl. Přesto je zajímavé zjištění, že methylace úseků intronu 1 a exonu 1 je velmi nízká a že téměř všechna methylovaná místa úseku B se nacházejí v oblasti intronu 2. Proto byla porovnána také methylace v jednotlivých CpG

místech nacházejících se v oblasti intronu 2. V místě 2235 byl nalezen statisticky významný rozdíl mezi alelami *DQB1*0602* a *DQB1*0501*, přičemž alela *DQB1*0602* byla v tomto místě methylována méně. Protože vazbu transkripčních faktorů na DNA může ovlivňovat i jediné CpG místo, je možné, že díky snížené methylaci této alely v místě 2235 je alela *DQB1*0602* více exprimována, což odpovídá i výsledkům Brittena *et al.* (2009), kteří pozorovali vyšší expresi alel *DQB1*06* oproti ostatním alelám. Protože tato analýza proběhla pouze u vzorků dětí, je možné, že se methylační stav oblasti intronu 1 a exonu 1 bude lišit u vzorků studentů a seniorů, kde bude tato oblast více methylována. Je však také možné, že se nejedná o epigenetickou regulační oblast a úroveň methylace tedy bude pro všechny věkové kategorie stejná.

7. SOUHRN

Tato diplomová práce je zaměřena na studium methylace DNA regulačních oblastí genů hlavního histokompatibilního komplexu II. třídy. Methylace DNA je jedním z regulačních mechanismů, kterým může být kontrolována úroveň exprese těchto molekul na povrchu antigen prezentujících buněk a to v závislosti na věku jedince. Odchytky v úrovni exprese MHC II. třídy jsou asociovány s autoimunitními onemocněními. Protože se zvyšujícím se věkem se zvyšuje i pravděpodobnost výskytu autoimunitních onemocnění, bylo cílem této práce porovnat methylační stav promotorových alel *DQA1* a míru exprese jednotlivých alel genu *DQA1* a zjistit, zda je mezi methylačním stavem promotoru a expresí genu *DQA1* asociace. Kromě genu *DQA1* byla analyzována také regulační oblast genu *DQB1* a porovnán methylační stav jeho jednotlivých alel.

Statisticky významné rozdíly v methylaci promotorových alel genu *DQA1* byly nalezeny při porovnávání methylace míst nacházejících se v pozicích -562 a -540, a to pro alelu QAP 1.1 (asociována s alelou *DQA1*0101*), která byla u vzorků seniorů methylována v menší míře než u vzorků studentů. Srovnání relativní úrovně exprese těchto alel statisticky významný rozdíl neprokázalo, ale byl nalezen statisticky významný rozdíl pro alelu QAP 4.1A (spojena s alelou *DQA1*0505*), jejíž relativní úroveň exprese byla vyšší u vzorků dětí než u vzorků dospělých.

Ve věkové kategorii studentů byly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými QAP alelami. Celková methylace alely QAP 1.3 a 4.1A byla nižší než celková methylace alel QAP 1.4, 2.1, 3.1 a 4.2. Alela QAP 1.3 byla navíc methylována méně než alela QAP 1.1. Statisticky významný rozdíl byl dále nalezen pro alelu QAP 3.1, která byla methylována více než alely QAP 2.1 a QAP 1.1. Při srovnání relativní úrovně exprese mRNA byl nalezen statisticky významný rozdíl pro alely asociované s promotorem QAP 4.1A (*DQA1*0505*), jejichž relativní úroveň exprese byla nižší než u alel asociovaných s promotory QAP 1.2L (*DQA1*0102*), 1.3 (*DQA1*0103*, **0104*) a 4.2 (*DQA1*0401*).

Statisticky významné rozdíly byly nalezeny také při porovnání methylace mezi QAP alelami věkové kategorie seniorů, a to pro alelu QAP 1.3, která je methylována méně než alely QAP 1.4 a 3.1, a pro alelu QAP 1.1, která byla methylována méně než alela QAP 3.1, stejně jako při porovnání věkové skupiny studentů.

Při analýze regulační oblasti genu *DQB1* se sice nepodařilo prokázat rozdíly v celkové methylaci jednotlivých alel, ale podařilo se prokázat rozdíl v místě 2235, kde alela *DQB1*0602* byla methylována méně než alela *DQB1*0501*.

Nepodařilo se však prokázat statisticky významný rozdíl mezi methylací QAP alel věkové skupiny dětí a nepodařilo se také prokázat souvislost methylace a relativní úrovní exprese. Protože však studie byla provedena na menším počtu vzorků, je možné, že po rozšíření souboru budou nalezeny další statisticky významné výsledky. Dalším krokem by tedy mělo být získání většího počtu dárců, zejména z věkové skupiny dětí a seniorů a dále také optimalizace primerů pro amplifikaci regulačního úseku alel *DQB1**02, *03, *04.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Agherbi, H., Gaussmann-Wenger, A., Verthuy, C., Chasson, L., Serrano, M., Djabali, M. „Polycomb mediated epigenetic silencing and replication timing at the INK4a/ARF locus during senescence.“ *PLoS One* 4 (2009).

Amir, R.E., Van den Veyver, I.B., Wan, M., Tran, C.Q., Francke, U., Zoghbi, H.Y. „Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG -binding protein 2.“ *Nature Genet* 23 (1999): 185-188.

Andersen, L., Ch., Beaty, J.S., Nettles, J.W., Seyfried, Ch.E., Nepom, G.T., Nepom, B.S. „Allelic polymorphism in transcriptional regulatory regions of HLA DQ genes .“ *J Exp Med* 173 (1991): 181–192.

Antequera, F. a Bird, A. „Number of CpG islands and genes in human and mouse.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (1993): 11995-11999.

Aoki, A., Suetake, I., Miyagawa, J., Fujio, T., Chijiwa, T., Sasaki, H., Tajima, S. „Enzymatic properties of de novo-type mouse DNA (cytosine-5) methyltransferases.“ *Nucleic Acids Res* 29 (2001): 3506-3512.

Baccarelli, A., Wright, R.O., Bollati, V., Tarantini, L., Litonjua, A.A., Suh, H.H., Zanobetti, A., Sparrow, D., Vokonas, P.S., Schwartz, J. „Rapid DNA methylation changes after exposure to traffic particles.“ *Am J Respir Crit Care Med* 179 (2009): 572-578.

Ball, M.P., Li, J.B., Gao, Y., Lee, J.H., LeProust, E.M., Park, I.H., Xie, B., Daley, G.Q., Church, G.M. „Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells.“ *Nat Biotechnol* 27 (2009): 361-485.

Barlow, D.P. „Gametic imprinting in mammals.“ *Science* 270 (1995): 1610-1613.

Bauer, U.M., Daujat, S., Nielsen, S.J., Nightingale, K., Kouzarides, T. „Methylation at arginine 17 of histone H3 is linked to gene activation.“ *EMBO Rep* 3 (2002): 39-44.

Baylin, S.B., Herman, J.G., Graff, J.R., Vertino, P.M., Issa, J.P. „Alternations in DNA methylation-a fundamental aspect of neoplasia.“ *Adv Cancer Res* 72 (1998): 141-196.

Bennet-Baker, P.E., Wilkowski, J., Burke, D.T. „Age-associated activation of epigenetically repressed genes in the mouse.“ *Genetics* 165 (2003): 2055-2062.

Beresford, G.W., Boss, J.M. „CIITA coordinates multiple histone acetylation modifications at the HLA-DRA promoter.“ *Nat Immunol* 2 (2001): 652-657.

Bernstein, B.E., Meissner, A., Lander, E.S. „The mammalian epigenome.“ *Cell* 128 (2007): 669-681.

Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., Jaenisch, R., Wagschal, A., Feil, R., Schreiber, S.L., Lander, E.S. „A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells.“ *Cell* 125 (2006): 315-326.

- Bestor, T., Laudano, A., Mattaliano, R., Ingram, V. „Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases.“ J Mol Biol. 203 (1988): 971-983.
- Bird, A.P., Wolffe, A.P. „Methylation-induced repression- belts, braces and chromatin.“ Cell 99 (1999): 451-454.
- Bjornsson, H.T., Sigurdsson, M.I., Fallin, M.D., Irizarry, R.A., Aspelund, T., Cui, H., Yu, W., Rongione, M.A., Ekström, T.J., Harris, T.B., Launer, L.J., Eiriksdottir, G., Leppert, M.F., Sapienza, C., Gudnason, V., Feinberg, A.P. „Intra-individual change over time in DNA methylation with familial clustering.“ JAMA 299 (2008): 2877-2883.
- Bowles, J., Knight, D., Smith, C., Wilhelm, D., Richman, J., Mamiya, S., Yashiro, K., Chawengsaksophak, K., Wilson, M.J., Rossant, J., Hamada, H., Koopman, P. „Retinoid signaling determines germ cell fate in mice.“ Science 312 (2006): 596-600.
- Breton, C.V., Byun, H.M., Wenten, M., Pan, F., Yang, A., Gilliland, A.F. „Prenatal tobacco smoke exposure affects global and gene-specific DNA methylation.“ Am J Respir Crit Care Med 180 (2009): 462-467.
- Britten, A.C., Mijovic, C.H., Barnett, A.H., Kelly, M.A. „Differential expression of HLA-DQ alleles in peripheral blood mononuclear.“ International Journal of Immunogenetics (2009): 47-57.
- Brünnler G., Haas J.P., Fan L.A., Petzl-Erler M.L., Volgger A., Yao Z., Wassmuth R., Albert E.D., Middleton D., Barboni F., Contu L., Alvarez L.R., Ferrara G.B., Adorno D., Gorodezky C., Alaez C., Cerna M., Mazzilli M.C.: *DQA1* promoter polymorphism: 12th International Histocompatibility Workshop study. In Charron D. eds.: Genetic diversity of HLA. Functional and Medical Implication. EDK Paris (1997): 171 –175.
- Burmester, G.-R., Pezzutto, A. Color atlas of immunology. Georg Thieme Verlag, 2003. Caiafa, P., Guastafierro, T., Zampieri, M. „Epigenetics: poly(ADP-ribosyl)ation of PARP-1 regulates genomic methylation patterns.“ FASEB J 23 (2009): 672-678.
- Cedar, H., Bergman, Y. „Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms.“ Nat Rev Genet 10 (2009): 295-304.
- Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M. „miR-15 and MmiR-16 induce apoptosis by targeting BCL2.“ Proc Natl Acad Sci USA 102 (2005): 13944-13949.
- Cross, S.H., Meehan, R.R., Nan, X., Bird, A. „A component of the transcriptional repressor MeCP1 shares a motif with DNA methyltransferase and HRX proteins.“ Nat Genet 16 (1997): 256-259.
- Donner, H., Seidl, C., Rau, H., Herwig, J., Seifried, E., Usadel, K.H. „Unbalanced amounts of HLA-*DQA1* allele mRNA: *DQA1**03 shows high and *DQA1**0501 low amounts of mRNA in heterozygous individuals.“ European Journal of Immunogenetics (2002): 321.
- Eden, A., Gaudet, F., Waghmare, A., Jaenisch, R. „Chromosomal Instability and Tumors Promoted by DNA Hypomethylation.“ Science 300 (2003): 455.

- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., Jones, P.A. „Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy.“ *Nature* 429 (2004): 457-463.
- Ehrlich, M. „Expression of various genes is controlled by DNA methylation.“ *J Cell Biochem* 88 (2003): 899–910.
- Ehrlich, M., Gama-Sossa, M.A., Huang L.H., Midgett R.M., Kuo, K.C., McCune R.A., Gehrke C. „Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissue of cells.“ *Nucleic Acids Res* 10 (1982): 2709-2721.
- Elgin, S.C., Grewal, S.I. „Heterochromatin: silence is golden.“ *Curr Biol* 13 (2003): 895-898.
- Esteller, M. „Epigenetics in cancer.“ *N Engl J Med* 358 (2008): 1148-1159.
- Esteve, P.O., Chin, H.G., Benner, J., Feehery, G.R., Samaranyake, M., Horwitz, G.A. „Regulation of DNMT1 stability through SET7-mediated lysine methylation in mammalian cells.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 106 (2009): 5076-5081.
- Feltus, F.A., Lee, E.K., Costello, J.F., Plass, C., Vertino, P.M. „Predicting aberrant CpG island methylation.“ *Proc Natl AcadSci USA* 100 (2003): 12253–12258.
- Fernandez, S., Wassmuth, R., Knerr, I., Frank, C., Haas, J.P. „Relative quantification of HLA-DRA1 and -*DQA1* expression by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR).“ *European Journal of Immunogenetics* 30 (2003): 141-148.
- Fraga, M.F., Ballestar, E., Paz, M.F., Ropero, S., Setien, F. „Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 102 (2005): 10604-10609.
- Fraga, M.F., Esteller, M. „Epigenetics and aging: the targets and the marks.“ *Trends Genet* 23 (2007): 413-418.
- Fuks, F., Burgers, W.A., Brehm, A., Hughes-Davies, L., Kouzarides, T. „DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity.“ *Nat Genet* 24 (2000): 88-91.
- Fuks, F., Burgers, W.A., Godin, N., Kasai, M., Kouzarides, T. „Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription.“ *EMBO J* 20 (2001): 2536-2544.
- Gartler, D.P., Goldman, M.A. „Biology of the X chromosome.“ *Curr Opin Pediatr* 13 2001: 340-345.
- Gentilini, D., Mari, D., Castaldi, D., Remondini, D., Ogliari, G., Ostan, R., Bucci, L., Sirchia, S.M., Tabano, S., Cavagnini, F., Monti, D., Franceschi, C., Di Blasio, A.M., Vitale, G. „Role of epigenetics in human aging and longevity: genome-wide DNA methylation profile in centenarians and centenarians' offspring.“ *Age* (2012).
- Georgantas, R.W., Hildreth, R., Morisot S. „CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 104 (2007): 5794-5804.
- Gillespie, K.M. *The Genetics of Type 1 Diabetes*. InTech (2011).

- Golbus, J., Palella, T.D., Richardson, B.D. „Quantitative changes in T cell DNA methylation occur during differentiation and ageing.“ *Eur J. Immunol.* 20 (1990): 1869–1872.
- Goll, M.G., Kirpekar, F., Maggert, K.A., Yoder, J.A., Hsieh, C.L., Zhang, X., Golic, K.G., Jacobsen, S.E., Bestor, T.H. „Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2.“ *Science* 311 (2006): 395-398.
- Gowher, H., Jeltsch, A. „Molecular enzymology of the catalytic domains of the Dnmt3a and Dnmt3b DNA methyltransferases.“ *J Biol Chem* 277 (2002): 20409–20414.
- Grandjean, V., Yaman, R., Cuzin, F., Rassoulzadegan, M. „Inheritance of an epigenetic mark: The CpG DNA methyltransferase 1 is required for de novo establishment of a complex pattern of non-CpG methylation.“ *PLoS ONE* 2 (2007).
- Gu, T.P., Guo, F., Yang, H., Wu, H.P., Xu, G.F., Liu, W., Xie, Z.G., Shi, L., He, X., Jin, S.G., Iqbal, K., Shi, Y.G., Deng, Z., Szabó, P.E., Pfeifer, G.P., Li, J., Xu, G.L. „The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes.“ *Nature* 477 (2011): 606-610.
- Hajkova, P., Erhardt, S., Lanec, N., Haaf, T., El-Maarri, O., Reik, W., Walter, J., Suranib, M.A. „Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells.“ *Mech. Dev.* 117 (2002): 15-23.
- Hannon, G.J. „RNA interference.“ *Nature* 418 (2002): 244-251.
- Heard, E., Clerc, P., Avner, P. „X-chromosome inactivation in mammals.“ *Annu Rev Genet* 31 (1997): 571-610.
- Hendrich, B., Bird, A. „Identification and Characterization of a Family of Mammalian Methyl-CpG Binding Proteins.“ *Mol Cell Biol* 18 (1998): 6538–6547.
- Hermann, A., Goyal, R., Jeltsch, A. „The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites.“ *J Biol Chem* 279 (2004): 48350–48359.
- Holliday, R., Pugh, J.E. „DNA modification mechanisms and gene activity during development.“ *Science* 187 (1975): 226–232.
- Hořejší, V., Bartůňková, J. *Základy imunologie*. Praha : Nakladatelství TRITON. 2009.
- Huidobro, C., Fernandez, A.F., Fraga, M.F. „Aging epigenetics: Causes and consequences.“ *Molecular aspects of medicine* (2012): 1-14.
- Huynh, K.D., Lee, J.T. „Inheritance of a pre-inactivated paternal X chromosome in early mouse embryos.“ *Nature* 426 (2003): 857-862.
- Chang, K.T., Min, K.T. „Regulation of lifespan by histone deacetylase.“ *Ageing Res Rev* 1 (2002): 313-326.
- Chen, T., Li, E. „Establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mammals.“ *Curr Top Microbiol* 301 (2006): 179–201.

- Chen, T., Ueda, Y., Dodge, J.E., Wang, Z., Li, E. „Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a and Dnmt3b.“ *Mol Cell Biol* 23 (2003): 5594-5605.
- Cheung, I., Shulha, H.P, Jiang, Y., Matevossian, A., Wang, J., Weng, Z., Akbariana, S. „Developmental regulation and individual differences of neuronal H3K4me3 epigenomes in the prefrontal cortex.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 107 (2010): 8824–8829.
- Chuang, L.S.H., Ian, H.-I., Koh, T.-W., Ng, H.-H., Xu, G., Li, B.F.L. „Human DNA-(Cytosine-5) Methyltransferase-PCNA Complex as a Target for p21WAF1.“ *Science* 277 (1997): 1996-2000.
- Issa, J.P., Ottaviano, Y.L., Celano, P., Hamilton, S.R., Davidson, N.E., Baylin, S.B. „Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon.“ *Nat Genet* 7 (1994): 536–540.
- Jair, K.W., Bachman, K.E., Suzuki, H., Ting, A.H., Rhee, I., Yen, R.W., Baylin, S.B., Schuebel, K.E. „De novo CpG island methylation in human cancer cells.“ *Cancer Res* (2006): 682-692.
- Jeltsch, A. „DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases.“ *Chembiochem* 3 (2002): 274-293.
- Jenuwein, T., Allis, C.D. „Translating the histone code.“ *Science* 293 (2001): 1074-1080.
- Johnson, F.B., Sinclair, D.A., Guarente, L. „Molecular Biology of aging.“ *Cell* 96 (1999): 291-302.
- Kafri, T., Ariel, M., Brandeis, M., Shemer, R., Urven, L., McCarrey, J., Cedar, H., Razin, A. „Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line.“ *Genes Dev* 6 (1992): 705-714.
- Kaminsky, Z.A., Tang, T., Wang, S.-C., Ptak, C., Oh, G.H.T., Wong, A.H.C., Feldcamp, L.A., Virtanen, C., Halfarson, J., Tysk, C., McRae, A.F., Visscher, P.M., Montgomery, G.W., Gottesman, I.I., Martin, N.G., Petronis, A. „DNA methylation profiles in monozygotic and dizygotic twins.“ *Nat Genet* 41 (2009): 240-245.
- Klimasauskas, S., Kumar, S., Roberts, R.J., Cheng, X. „HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix.“ *Cell* 76 (1994): 357–369.
- Kriaucionis, S., Heintz, N. „The nuclear DNA base5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain.“ *Science* 324 (2009): 929-930.
- Kucharski, R., Maleszka, J., Foret, S., Maleszka, R. „Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation.“ *Science* 319 (2008): 1827-1830.
- Lane, N., Dean, W., Erhardt, S., Hajkova, P., Surani, A., Walter, J., Reik, W. „Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse.“ *Genesis* 35 (2003): 88-93.
- Lara, E., Mai, A., Calvanese, V., Altucci, L., Lopez-Nieva, P., Martinez-Chantar, M.L., Varela-Rey, M., Rotili, D., Nebbioso, A., Ropero, S., MonMontoya, G. *et al.* „Salermide, a Sirtuin inhibitor with a strong cancer-specific proapoptotic effect.“ *Oncogene* 28 (2009): 781-791.

- Leone, G., D'Alò, F., Zardo, G., Voso, M.T., Nervi, C. „Epigenetic Treatment of Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemias.“ *Curr. Med. Chem.* 15 (2008): 1274–1287.
- Li, E. „Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development.“ *Nature Rev. Genet.* 3 (2002): 662-673.
- Li, E., Beard, C., Jaenisch, R. „Role for DNA methylation in genomic imprinting.“ *Nature* (1993): 362-365.
- Li, E., Bestor, T.H., Jaenisch, R. „Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality.“ *Cell* 69 (1992): 915-926.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Zinpursky, L., Darnell, J. *Molecular Cell Biology*. New York: W. H. Freeman, 2003.
- Lorincz, M.C., Dickerson, D.R., Schmitt, M., Groudine, M. „Intragenic DNA methylation alters chromatin structure and elongation efficiency in mammalian cells.“ *Nat Struct Mol Biol* 11 (2004): 1068-1075.
- Maatouk, D.M., Kellam, L.D., Mann, M.R., Lei, H., Li, E., Bartolomei, M.S., Resnick, J.L. „DNA methylation is a primary mechanism for silencing postmigratory primordial germ cell genes in both germ cell and somatic cell lineages.“ *Development* 133 (2006): 3411-3418.
- Majumder, P., Boss, J.M. „DNA methylation dysregulates and silences HLA-DQ locus by altering chromatin architecture.“ *Genes and Immunity* 12 (2011): 291-299.
- Majumder, P., Gomez, J.A., Chadwick, B.P., Boss, J.M. „The insulator factor CTCF controls MHC II class gene expression and is required for the formation of long-distance chromatin interactions.“ *J Exp Med* 205 (2008): 785-798.
- Mak, W., Nesterova, T.B., de Napoles, M., Appanah, R., Yamanaka, S., „Reactivation of the paternal X chromosome in early mouse embryos.“ *Science* 303 (2004): 666-669.
- Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R., Haaf, T. „Demethylation of the zygotic paternal genome.“ *Nature* 403 (2000): 501-502.
- McFarlane, A.J., Strom, A., Scott, F.W. „Epigenetic: deciphering how environmental factors may modify autoimmune type 1 diabetes.“ *Mamm Genome* 20 (2009): 624-632.
- Mehra, N.K. *The Hla Complex in Biology and Medicine: A Resource Book*. Jaypee Brothers Medical Publishers Ltd, 2010.
- Meyerhans, A., Vartanian, J.-P., Wain-Hobson, S. „DNA recombination during PCR.“ *Nucleic Acids Research* 18 (1990): 1687-1692.
- Millar, C.B., Guy, J., Sansom, O.J., Selfridge, J., MacDougall, E., Hendrich, B., Keightley, P.D., Bishop, S.M., Clarke, A.R., Bird, A. „Enhanced CpG mutability and tumorigenesis in MBD4-deficient mice.“ *Science* 297 (2002): 403-405.

- Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. „A simple salting out procedure extracting DNA from human nucleated cells.“ *Nucleic Acids Research* 16 (1998): 1215 - 1215
- Morita, K., Han, M. „Multiple mechanisms are involved in regulating the expression of the developmental timing regulator *lin-28* in *Caenorhabditis elegans*.“ *EMBO J* 25 (2006): 5794-5804.
- Mortusewicz, O., Schermelleh, L., Walter, J., Cardoso, M.C., Leonhardt, H. „Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 102 (2005): 8905–8909.
- Muhonen, P., Holthofer, H. „Epigenetic and microRNA-mediated regulation in diabetes.“ *Nephrol Dial Transplant* 24 (2009): 1088-1096.
- Ng, H.H., Zhang, Y., Hendrich, B., Johnson, C.A., Turner, B.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Reinberg, D., Bird, A. „MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex.“ *Nat Genet* 23 (1999): 58-61.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A. „DNA methyltransferases *Dnmt3a* and *Dnmt3b* are essential for de novo methylation and mammalian development.“ *Cell* 99 (1999): 247-257.
- Ooi, S.K.T., Qiu, C., Bernstein, E., Li, K., Jia, D., Yang, Z. „DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3.“ *Nature* 448 (2007): 714-717.
- Osley, M.A., Fleming, A.B., Kao, C.F. „Histone ubiquitylation and the regulation of transcription.“ *Results Probl Cell Differ* 41 (2006): 47-75.
- Prokhortchouk, A., Hendrich, B., Jørgensen, H., Ruzov, A., Wilm, M., Georgiev, G., Bird, A., Prokhortchouk, E. „The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor.“ *Genes Dev* 15 (2001): 1613-1618.
- Pruitt, K., Zinn, R.L., Ohm, J.E., McGarvey, K.M., Kang, S.H., Watkins, D.N., „Inhibition of SIRT1 reactivates silenced cancer genes without loss of DNA methylation.“ *PLoS Genet* 2 (2006).
- Qiu, C., Sawada, K., Zhang, X., Cheng, X. „The PWWP domain of mammalian DNA methyltransferase *Dnmt3b*.“ *Nat Struct Biol* 9 (2002): 217-224.
- Rakyan, V.K., Blewitt, M.E., Druker, R., Preis, J.I., Whitelaw, E. „Metastable epialleles in mammals.“ *Trends Genet* 18 (2002): 348-351.
- Robertson, K.D. „DNA methylation and human disease.“ *Nat Rev Genet* 6 (2005).
- Robertson, K.D., Uzvolgyi, E., Liang, G., Talmadge, C., Sumegi, J., Gonzales, F.A., Jones, P.A. „The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors.“ *Nucleic Acids Res* 27 (1999): 2291-2298.
- Rogina, B., Helfand, S.L. „Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (2004): 15998–16003.

- Rougier, N., Bourc'his, D., Gomes, D.M., Niveleau, A., Plachot, M., Páldi, A., Viegas-Péquignot, E. „Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development. .“ *Genes & Development* 12 (1998): 2108-2113.
- Sarg, B., Koutzamani, E., Helliger, W., Rundquist, I., Lindner, H.H. „Postsynthetic trimethylation of histone H4 at lysine 20 in mammalian tissues is associated with ageing.“ *J Biol Chem* 277 (2002): 39195–39201.
- Seki, Y., Hayashi, K., Itoh, K., Mizugaki, M., Saitou, M., Matsui, Y. „Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice.“ *Dev Biol.* 278 (2005): 440-458.
- Seki, Y., Yamaji, M., Yabuta, Y., Sano, M., Shigeta, M., Matsui, Y., Saga, Y., Tachibana, M., Shinkai, Y., Saitou, M. „Cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in migrating primordial germ cells in mice.“ *Development* 134 (2007): 2627-2638.
- Shen, L., Kondo, Y., Hamilton, S.R., Rashid, A., Issa, J.P. „P14 methylation in human colon cancer is associated with microsatellite instability and wild-type p53.“ *Gastroenterology* 124 (2003): 622-633.
- Shumaker, D.K., Dechat, T., Kohlmaier, A., Adam, S.A., Bozovsky, M.R., Erdos, M.R., Eriksson, M., Goldman, A.E., Khuon, S., Collins, F.S., Jenuwein, T., Goldman, R.D. „Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (2006): 8703-8708.
- Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoot, M., Leblanc, B., Cavalli, G. „Genome regulation by polycomb and trithorax proteins.“ *Cell* 128 (2007): 735-745.
- Sidju, S.K., Minks, J., Chang, S.C, Cotton, A.M, Brown, C.J. „X chromosome inactivation: heterogeneity of heterochromatin.“ *Biochem Cell Biol* 86 (2008): 370-379.
- Slagboom, P.E., Leeuw, W.J., Vijg, J. „Messenger RNA levels and methylation patterns of GADPH and beta-actin genes in rat liver, spleen and brain in relation to ageing.“ *Mech Ageing Dev* 53 (1990): 243-257.
- So, K., Tamura, G., Honda, T., Homma, N., Waki, T., Togawa, N., Nishizuka, S., Motoyama, T. „Multiple tumor suppressor genes are increasingly methylated with age in non-neoplastic gastric epithelia.“ *Cancer* 97 (2006): 1155–1158.
- Su, Z., Han, L., Zaho, Z. „Conservation and divergence of DNA methylation in eukaryotes.“ *Epigenetics* 6 (2011): 134-140.
- Suetake, I., Shinozaki, F., Miyagawa, J., Takeshima, H., Tajima, S. „DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction.“ *J Biol Chem* 279 (2004): 27816-27823.
- Swanberg, M., Lidman, O., Padyukov, L., Eriksson, P., Akesson, E., Jagodic, M., Lobell, A., Khademi, M., Börjesson, O., Lindgren, C.M., *et al.* „MHC2TA is associated with differential MHC molecule

expression and susceptibility to rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and myocardial infarction.“ *Nat Genet* 37 (2005): 486-94.

Szyf, M. „Targeting DNA methylation in cancer.“ *Bulletin du Cancer* 93 (2006): 961-972.

T Kafri, Ariel, M., Brandeis, M., Shemer, R., Urven, J., McCarrey, J., Cedar, H., Razin, A. „Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line.“ *Genes Dev* 6 (1992): 705-714.

Takai, D., Jones, P.A. „The CpG island searcher: a new WWW resource.“ *In Silico Biol* 3 (2003): 235-240.

Tam, P.P, Zhou, S.X., Tan, S.S. „X-chromosome activity of the mouse primordial germ cells revealed by the expression of an X-linked lacZ transgene.“ *Development* 120 (1994): 2925–2932.

Thaku, M.K., Kanungo, M.S. „Methylation of chromosomal proteins and DNA of rat brain and its modulation by estradiol and calcium during ageing.“ *Exp Gerontol* (1981): 331-336.

Ting, J.P., Trowsdale, J. „Genetic control of MHC class II expression.“ *Cell* (2002): S21-S33.

Tissenbaum, H.A., Guarente, L. „Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*.“ *Nature* 410 (2001): 227-230.

Toyota, M., Ho, C., Ahuja, N., Jair K.W., Ohe-Toyota, M., Baylin, S.B. „Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification.“ *Cancer Res.* 59 (1999): 2307–2312.

Tudor, M., Akbarian, S., Chen, R.Z., Jaenisch, R. „Transcriptional profiling of a mouse model for Rett syndrome reveals subtle transcriptional changes in the brain.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (2002): 15536–15541.

Ushijima, T., Watanabe, N., Okochi, E., Kaneda, A., Sugimura, T., Miyamoto, K. „Fidelity of the methylation pattern and its variation in the genome.“ *Genome Res* 13 (2003): 868-874.

Van den Wyngaert, I., Sprengel, J., Kass, S.U., Luyten, W.H. „Cloning and analysis of a novel human putative DNA methyltransferase.“ *FEBS Lett* 426 (1998): 283-289.

Vaquero, A., Scher, M., Lee, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Reinberg, D. „Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin.“ *Mol Cell* 16 (2004): 93-105.

Wade, P.A., Geggion, A., Jones, P.L., Ballestar, E., Aubry, F., Wolffe, A.P. „Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation.“ *Nat Genet* 23 (1999): 62-66.

Walsh, C. *Enzymatic Reaction Mechanisms*. San Francisco: W.H. Freeman, 1979.

Wang, H., Huang, Z.Q., Xia, L., Feng, Q., Erdjument-Bromage, H., Strahl, B.D. „Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor.“ *Science* 293 (2001): 853-857.

Weaver, I.C., Cervoni, N., Champagne, F.A., D'Alessio, A.C., D'Alessio, A.C., Sharma, S., Seckl, J.R., Dymov, S., Szyf, M., Meaney, M.J. „Epigenetic programming by maternal behavior.“ *Nature Neuroscience* 7 (2004): 847-854.

Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M.B., Ramos, L., Paabo, S., Rebham, N., Schubeler, D. „Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome.“ *Nat Genet* 39 (2007): 457-66.

Wilson, V.L., Smith, R.A., Ma, S., Cutler, R.G. „Genomic 5-methyldeoxycytidine decreases with age.“ *J Biol Chem* 262 (1987): 9948-9951.

Wu, J.C., Santi, D.V. „Kinetic and catalytic mechanism of HhaI methyltransferase.“ *J Biol Chem* 262 (1987): 4778-4786.

Yatabe, Y., Tavaré, S., Shibata, D. „Investigating stem cells in human colon by using methylation patterns.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (2001): 10839-10844.

Zajacová, M. Stanovení expresních markerů genu HLA II. třídy. Diplomová práce. Praha: Univerzita Karlova, 2009.

Zhang, H., Zhu, Z., Meadows, G.G. „Chronic alcohol consumption decreases the percentage and number of NK cells in the peripheral lymph nodes and exacerbates B16BL6 melanoma metastasis into the draining lymph nodes.“ *Cell Immunol* 266 (2010): 172-179.

Zhang, X., Bruice, T.C. „The mechanism of M.HhaI DNA C5 cytosine methyltransferase enzyme: a quantum mechanics/molecular mechanics approach.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (2006): 6148-6153.

Zhao, Y., Srivastava, D. „A developmental view of microRNA function.“ *Trends Biochem Sci* 32 (2007): 189-197.

Zinkovskaia, G.G., Berdyshev G.D., Vaniushin, B.F. „Tissue-specific decrease and change in the character of DNA methylation in cattle with aging.“ *Biokhimiia* 43 (1978): 1883-1892.

9. PŘÍLOHY

Příloha 1: Znáznornění sekvence promotoru genu *DQAI* po bisulfitové konverzi. Červeně jsou vyznačena místa, kde nasedají primery používané na začátku práce, zeleně primery používané po výskytu kontaminace. CpG místa jsou podbarvena šedě, CpG místa pro která byla objevena statisticky významná odchylka v methylaci mezi jednotlivými alelami jsou podbarvena modrým pozadím.

```
850                                     -801
TTTTATACCGT ATTGTGGAAG TTAAAAGAAA AATAGTTAAT TTATATATAG
-800                                     -751
AAGTTAGAGA AAGGGTAGGG GATGGGGATT GTTAGGGAGG GAAATTAATT
-750                                     -701
TAGGGAAAAA TTTTTGGAGG TTGTAAGTTA GAATATTTTG AAGGATGTGG
-700                                     -651
TATAATTGAT GATTTTATTT ATTTACCGAGG TTGTTTAGAA ATGTTTATTT
-650                                     -601
TTGGTTAGGC GCGGTGGTTT ATGTTTGTAA TTTGAGTATT TTGGGAGGTT
-600                                     -551
GAGACCGGTA GATTATGAGG TTAGGAGTTT AAGATTAGCG TGGTTAATAT
-550                                     -501
AGTGAAATTT CGTTTTTATT AAAAATATAA AAATTAGTTG GGCGTGGTGG
-500                                     -451
TAGGTGTTTG TAGTTTTAGT TATTTGGGAG GGTGAGGGAG GAGAATCGTT
-450                                     -401
TGAATTCCGG AGGTAAAGGT TGTAGTGAGT CGAGATTTTG TTATTGTATT
-400                                     -351
TTAGTTTGGG TGATAGAGTG AGATTACGTT TTAAAAAAGAA AGAAAAAGAA
-350                                     -301
AAGAAAAAGG AAAAAAAGA AAAATATTTA TTTTTTTTGC GATTGGTAGA
-300                                     -251
TATGTATATA TTAGAGAAGA TTTTAATTTA ATGTTTTTTT TTTATTTATA
-250                                     -201
GAATAATTTT TTAAGTTTAT TTTGAGTAGA GGTGTATTAT TAA---GGGG
-200                                     -151
ATTGTTTCCG TTTTTTTTGT GGTTTTTTAAT ATAAATTTTT TAATTAGTAA
-150                                     -101
TTGAGATGTT ATTATAGGGG ATTTTTTTAA TTGGTTAAAA TTTGATTTGG
-100                                     -51
TAGGGTTTGG TTTGGGTGTT TTTAGATTTT TTTGTTTTGA GGTTTTTTATA
-50                                     -1
ATTATTTTAT AGTTTAGAAT ATTAATTGTT GAGGTTGTTT TGGAAGAGG ATG
```


D4D4	2.1	●	●	TA	●	TA	●	TG	●	TA	TA	CA	●	●	●	●	●	●	TA	CT	CA
D1D6	4.1A	~C	●	CA	●	●	AG	TG	●	●	●	CA	TA	●	●	TA	~A	AA	●	●	CA
D1D7	4.1A	~C	●	CA	●	●	AG	TG	●	●	●	CA	TA	●	●	TA	~A	AA	●	●	CA
D10D11	4.1A	~C	●	CA	●	●	AA	TG	●	●	●	CA	TA	●	○	TA	~A	AA	●	●	CA
D10D13	4.1A	~C	●	CA	●	●	AA	TG	●	●	●	CA	TA	●	●	TA	~A	AA	●	●	CA
D10D9	4.1A	~C	●	CA	●	●	AA	TG	●	●	●	CA	TA	●	●	TA	~A	AA	●	●	CA
S1D1	1.1	TA	●	○	TG	TA	●	○	TG	●	TG	TG	●	●	●	●	TA	●	TA		●
S1D6	1.1	TA	●	●	TG	TA	●	●	TG	○	TG	TG	●	●	●	●	TA	●	TA		○
S1D8	1.1	TA	●	○	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	○	○	●	●	TA	●	TA		○
S2D1	1.1	TA	●	○	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	○	●	●	●		●	TA	AG	○
S2D2	1.1	TA	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	●	●	●	●	TA	○	TA		○
S11D1	1.1	TA	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	●	●	●	●	T-	○	TA	AG	○
S11K1	1.1						●	●	CA	●	CA	CA	●	●	●	●	~A	○	TA	CT	○
S12D1	1.1	TA	●	●	CA	TA	●	●	CA	●	CA	CA	●	●	●	●	~A	●	TA	CT	○
S12D2	1.1	TA	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	●	●	●	●	T-	●	TA	AG	●
S12D3	1.1	TA	●	●	CA	TA	●	●	CA	●	CA	CA	●	●	●	○	~A	●	TA	CT	●
S12D4	1.1	TA	●	●	CA	TA	●	●	CA	●	CA	CA	●	●	●	●	~A	○	TA	CT	○
S12D7	1.1	TA	●	○	CA	TA	●	●	CA	○	CA	CA	●	●	●	○	~A	○	TA	CC	○
S12D8	1.1	TA	○	●	CA	TA	●	●	CA	●	CA	CA	●	●	●	●	~A	○	TA	CT	○
S20K2	1.1						●	●	CA	●	CA	CA	●	●	●	●	~A	○	TA	CT	○
S20K4	1.1						●	●	CA	●	CA	CA	●	●	●	●	~A	○	TA	CT	○
S20K7	1.1						●	●	CA	●	CA	CA	●	●	●	●	~A	○	TA	CT	○
S20K8	1.1						●	●	CA	●	CA	CA	●	●	●	●	~A	●	TT	CT	○
S17	1.2K	●	●	●	TG	TA	●	T-	TG	●	TG		●	●	●	●	T-	●	TA	AA	○
S4D1	1.2L	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	○	TG	TG	●	●	●	●		●	TA	AA	●
S4D2	1.2L	●	●	●	TG	TA	○	○	TG	○	TG	TG	●	●	●	●		○	TA	AA	○
S4D3	1.2L	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	●	●	●	●		●	TA	AA	○
S4D4	1.2L	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	●	●	●	●		●	TA	AA	○

S4D5	1.2L	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	●	●	●	●		●	TA	AA	○
S3D1	1.2L	○	○	○	TG	TA	○	○	TG	○	TG	TG	●	●	●	○	TA	●	TA		●
S3D2	1.2L	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	●	●	●	●	TA	●	TA		○
S3D3	1.2L	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	○	TG	TG	○	○	○	○	TA	○	TA		○
S3D4	1.2L	○	○	○	TG	TA	○	○	TG	○	TG	TG	○	○	○	○	TA	○	TA		○
S3D5	1.2L	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	●	●	●	●	TA	○	TA		●
S15	1.2L	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG		●	●	●	●	T-	○	TA	AA	●
S16	1.2L	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG		●	●	●	●	T-	●	TA	AA	○
S15D2	1.2L	●	●	●	CA	TA	●	●	CA	●	CA	CA	●	●	●	●	~A	○	TA	TT	○
S15D3	1.2L	●	●	●	CA	TA	●	●	CA	●	CA	CA	●	●	●	●	~A	●	TA	TT	○
S7D1	1.3	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	●	●	●	TG	TA	○	TA		○
S8D1	1.3	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	●	●	●	TG	TA	TA	TA		○
S10D1	1.3	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	●	●	●	TG	?	○			○
S10D2	1.3	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	●	●	●	TG	TA	○	TA		○
S10D3	1.3	●	●	○	TG	TA	○	○	TG	○	TG	TG	○	○	○	TG	TA	○	TA		○
S10D4	1.3	○	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	●	●	●	TG	TA	●	TA		○
S10D5	1.3	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	●	●	●	TG	TA	○	TA		○
S20K5	1.3						●	●	CA	●	CA	CA	●	●	●	CA	~A	●	TA	CT	○
S6D1	1.4	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	●	●	●	●	-T	●	TA	TG	●
S6D2	1.4	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	●	●	●	●		○	TA	TG	○
S6D3	1.4	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	●	●	●	●		●	TA	TG	●
S6D4	1.4	●	○	○	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	●	●	●	●		○	TA	TG	○
S6D5	1.4	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	●	●	●	●		●	TA	TG	●
S14D6	1.4	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG		●	●	●	●	T-	○	TA	TG	○
S14D7	1.4	○	○	○	CA	TA	○	○	CA	○	CA	CA	○	○	○	○	~A	○	TA	CA	○
S13K3	1.4						●	●	CA	●	CA	CA	●	●	●	●	~A	●	TA	CA	○
S13K4	1.4						●	●	CA	●	CA	CA	●	●	●	●	~A	○	TA	CA	○
S13K5	1.4						●	○	CA	●	CA	CA	●	●	●	●	~A	●	TA	CG	●

<

S13K7	1.4						•	•	CA	•	CA	CA	•	•	•	•	~A	•	TA	CA	○
S13K8	1.4						•	•	CA	•	CA	CA	•	•	•	•	~A	•	TA	CA	○
S8D2	2.1	•	•	TA	•	TA	•	TG	•	TA	TA	TG	•	•	•	•	•	•	TA		TG
S8D3	2.1	•	•	TA	•	TA	•	TG	•	TA	TA	TG	•	•	•	•	•	•	TA		TG
S8D4	2.1	•	•	TA	•	TA	•	TG	•	TA	TA	TG	•	•	•	•	•	○	TA		TG
S8D5	2.1	•	•	TA	•	TA	•	TG	•	TA	TA	TG	•	•	•	•	•	•	TA		TG
S19D1	2.1	•	•	TA	•	TA	•	TG	•	TA	TA	TG	•	•	•	•	•	•	TA		TG
S19D2	2.1	•	•	TA	•	TA	•	TG	•	TA	TA	TG	•	•	•	•	•	•	TG		TG
S19D3	2.1	•	•	TA	•	TA	•	TG	•	TA	TA	TG	•	•	•	•	•	○	TA		TG
S19D4	2.1	•	•	TA	•	TA	•	TG	•	TA	TA	TG	•	•	•	○	○	•	TA		TG
S19D5	2.1	•	•	TA	•	TA	•	TG	•	TA	TA	TG	•	•	•	•	•	•	TA		TG
S19D6	2.1	•	•	TA	•	TA	•	TG	•	TA	TA	TG	•	•	•	•	•	•	TA		TG
S19D7	2.1	•	•	TA	•	TA	•	TG	•	TA	TA	TG	•	•	•	•	•	•	TA		TG
S16D1	2.1	•	•	TA	•	TA	•	TG	•	TA	TA		•	•	•	•	•	•	TA	AG	TG
S18K1	2.1						•	CA	•	TA	TA	CA	•	•	•	•	•	•	TA	CT	CA
S11D1	2.1	•	•	TA	•	TA	•	CA	•	TA	TA	CA	•	•	•	•	•	•	TA	CT	CA
S11D11	2.1	•	•	TA	•	TG	○	CA	○	TA	TA	CA	○	•	•	•	•	○	TA	CT	CA
S18K6	2.1						•	CA	•	TA	TA	CA	•	•	•	•	•	•	TA	CT	CA
S1D2	3.1	TA	○	TA	TG	TA	•	TG	•	TA	•	•	•	TG	•	•	•	•	TA		TG
S2D1	3.1	TA	•	TA	TG	TA	•	TG	•	TA	•	•	○	TG	•	•	•	•	TA	AG	TG
S15D1	3.1	TA	•	TA	CA	TA	•	CA	•	TA	•	•	•	CA	•	•	•	•	TA	CT	CA
S15D4	3.1	TA	○	TA	CA	TA	•	CA	•	TA	•	•	•	CA	•	•	•	○	TA	CT	CA
S9D1	4.1A	-G	•	TG	•	•	TT	TG	•	•	•	TG	TA	•	•	TA		TT	•	○	TG
S9D2	4.1A	-G	•	TG	•	•	TT	TG	•	•	•	TG	TA	•	•	TA		TT	•	•	TG
S5D1	4.1A	-G	•	TG	•	•	TT	TG	•	•	•	TG	TA	•	•	TA		TT	•	○	TG
S5D2	4.1A	-G	•	TG	•	•	TT	TG	•	•	•	TG	TA	•	•	TA		TT	•	○	TG
S5D3	4.1A	-G	•	TG	•	•	TT	TG	•	•	•	TG	TA	•	•	TA		TT	•	•	TG
S5D4	4.1A	-G	•	TG	•	•	TT	TG	•	•	•	TG	TA	•	•	TA		TT	•	•	TG

S5D5	4.1A	-G	●	TG	●	●	TT	TG	●	●	●	TG	TA	●	●	TA		TC	●	●	TG
S17D1	4.1A	-G	●		○	●	TT	TG	●	●	●	TG	TA	●	●	TA	T-	TT	●	●	TG
S17D2	4.1A	-G	●	TG	●	●	TT	TG	●	●	●		TA	●	●	TA	T-	TT	●	○	TG
S5	4.2	○	TA	TT	●	●	●	●	●	TT	●	TG	●	TG	●	TG	●	●	TA	TA	○
S5	4.2	○	TA	TT	●	○	●	●	●	TT	●	TG	●	TA	●	TG	●	●	TA	TA	●
S5	4.2	○	TA	CT	●	●	●	●	●	TT	●	TG	●	TA	●	TG	●	●	TA	TA	●
S5	4.2	○	TA	TT	●	●	●	●	●	TT	●	TG	●	TA	●	TG	●	●	TA	CA	○
S19	4.2	○	TA	TT	●	●	●	●	●	TT	●	TG	●	TA	○	TG	●	●	TA	TA	○
S19	4.2	○	TA	TT	●	●	●	●	●	TT	●	TG	●	TA	●	TG	●	●	TA	TA	●
S19	4.2	○	TA	TT	●	●	●	●	●	TT	○	TG	●	TA	●	TG	●	●	TA	TA	○
S19	4.2	○	TA	TT	●	●	●	●	●	TT	●	TG	●	TA	●	TG	○	○	TA	TA	○
S19	4.2	○	TA	TT	●	●	●	●	●	TT	●	TG	●	TA	●	TG	●	○	TA	TA	○
S18	4.2	○	TA	TT	●	●	●	●	●	TT	●	TG	●	TA	●	TG	●	●	TA	TA	X
S18	4.2	○	TA	TT	●	●	●	●	●	TT	●	TG	○	TA	●	TG	●	○	TA	TA	○
S18	4.2	○	TA	TT	●	●	●	●	●	TT	●	TG	●	TA	●	TG	●	●	TA	TA	○
S18	4.2	○	TA	TT	●	●	●	○	●	TT	●	TG	●	TA	●	TG	●	●	TA	TA	○
S18	4.2	○	TA	TT	●	●	●	●	●	TT	●	TG	●	TA	●	TG	●	●	TA	TA	○
P8K1	1.1						○	○	CA	●	CA	CA	●	●	●	●	AA	●	TA	CT	●
P8K6	1.1						●	●	CA	●	CA	CA	●	●	●	●	~A	●	TA	CT	○
P8K7	1.1						○	●	CA	●	CA	CA	●	●	○	●	~A	●	TA	CT	○
P8K8	1.1						○	○	CA	○	CA	CA	○	○	○	○	~A	○	TA	CT	○
P11K2	1.1						●	○	CA	●	CA	CA	●	●	●	●	~A	●	TA	CT	○
P11K4	1.1						●	○	CA	●	CA	CA	●	●	●	●	~A	●	TA	CT	○
P5K1	1.2L						●	●	CA	●	CA	CA	●	●	●	●	~A	●	TA	TT	○
P5K5	1.2L						●	●	CA	●	CA	CA	●	●	●	●	AA	●	TA	TT	○
P5K6	1.2L						●	●	CA	●	CA	CA	●	●	●	●	~A	●	TA	TT	○
P5K8	1.2L						●	●	CA	●	CA	CA	●	●	●	●	~A	●	TA	TT	○
P13K2	1.3						●	●	CA	●	CA	CA	●	●	●	CA	~A	○	TA	CT	○

P13K3	1.3						•	•	CA	•	CA	CA	•	•	•	CA	AA	•	TA	CT	○
P9K1	1.3						•	•	CA	•	CA	CA	•	•	•	CA	AA	•	TA	CT	○
P9K3	1.3						•	•	CA	•	CA	CA	•	•	•	CA	AA	○	TG	CT	○
P9K5	1.3						•	•	CA	•	CA	CA	•	•	•	CA	AA	○	TA	CT	○
P15K2	1.4						•	•	CA	•	CA	CA	•	•	•	•	A~	•	TA	CA	○
P15K3	1.4						•	•	CA	•	CA	CA	•	•	•	•	A~	•	TA	CA	○
P15K4	1.4						•	•	CA	•	CA	CA	•	•	•	•	AA	•	TA	CA	○
P15K5	1.4						•	•	CA	•	CA	CA	•	•	•	•	A~	•	TA	CA	○
P15K6	1.4						•	•	CA	•	CA	CA	•	•	•	•	~A	○	TA	CA	○
P15K7	1.4						•	•	CA	•	CA	CA	•	•	•	•	~A	○	TA	CA	○
P15K8	1.4						•	•	CA	•	CA	CA	•	•	•	•	~A	○	TA	CA	○
P14K1	2.1						•	CA	•	TA	TA	CA	•	•	•	•	•	○	TA	CT	CA
P1D1	2.1	•	•	TA	•	TA	•	TG	•	TA	TA	TG	•	•	•	•	•	•	TA	AG	TG
P1D2	2.1	•	AG	TA	•	TA	•	TG	○	CA	TA	TG	○	•	•	•	•	○	TA	AG	TG
P1D3	2.1	•	•	TA	○	TA	•	TG	•	TA	TA	TG	•	•	•	•	•	•	TA	AG	TG
P1D4	2.1	•	•	TA	○	TA	•	TG	•	TA	TA	TG	•	•	•	•	•	•	TA	AG	TG
P1D5	2.1	•	•	TA	○	TA	•	TG	•	TA	TA	TG	•	•	•	•	•	•	TA	AG	TG
P14K10	3.1						•	CA	•	TA	•	•	•	CA	•	•	•	○	TA	CT	CA
P14K2	3.1						•	CA	•	TA	•	•	•	CA	•	•	•	•	TA	CT	CA
P14K4	3.1						•	CA	•	TA	•	•	•	CA	•	•	•	○	TA	CT	CA
P14K9	3.1						•	CA	•	TA	•	•	•	CA	•	○	•	•	TA	CT	CA

Příloha 3: Zobrazení CpG míst v regulační oblasti genu DQB1-úsek A pro jednotlivé sekvence vzorků.

č. vzorku	DQB1 alela	1111	1113	1123	1151	1153	1161	1237	1243	1248	1286	1298	1335	1359	1367	1374	1386	1405	1408	1430	1432	1439	1443	1444	1447	1461	1463	1465	1469	1483	1488
D4-2	0501	o	o	o	o	TA	AA	•	•	•	o	o	•	o	o	AA	o	o	o	o	AA	o	AA	CA	o	o	o	o	o	o	o
D4-3	0501	o	o	o	o	TA	AA	o	o	o	o	o	o	o	o	AA	o	o	o	o	AA	o	AA	CA	o	o	o	o	o	o	o
D4-4	0501	•	o	o	o	TA	AA	o	o	o	o	o	o	o	•	AA	o	o	o	o	AA	o	AA	CA	o	o	o	•	o	o	•
D4-8	0501	o	o	o	•	TA	AA	o	o	o	o	o	o	o	o	AA	o	o	o	o	AA	o	AA	CA	o	o	o	o	o	o	o
D5-1	0503	o	o	o	o	TA	AA	•	•	•	o	o	o	o	o	AA	o	o	o	o	AA	o	AA	CA	o	o	o	o	o	o	o
D5-2	0503	o	o	o	o	TA	AA	o	o	o	o	o	o	o	o	AA	o	o	o	o	AA	o	AA	CA	o	o	o	o	•	o	o
D5-3	0503	•	•	o	•	TA	AA	o	o	o	o	•	o	o	o	AA	o	o	o	o	AA	o	AA	CA	o	o	o	o	o	o	o
D5-5	0503	o	o	o	o	TA	AA	o	o	o	o	o	o	o	o	AA	o	o	o	o	AA	o	AA	CA	o	o	o	o	o	o	o
D7-4	0503	•	o	o	•	TA	AA	o	o	o	o	o	o	o	o	AA	o	o	o	o	AA	o	AA	CA	o	o	o	o	o	o	o
D6-10	0602	o	o	o	AA	o	o	o	o	CA	o	•	AA	TA	CT	o	•	o	o	o	AA	o	o	CC	o	o	o	o	o	TA	o
D6-11	0602	o	o	o	AA	o	•	o	o	CA	o	o	AA	TA	CT	o	o	o	o	o	AA	o	o	CC	o	o	o	o	o	TA	o
D6-15	0602	•	o	o	AA	o	o	•	o	CA	o	o	AA	TA	CT	o	o	o	o	o	AA	o	o	CC	o	o	o	o	o	TA	o
		1498	1501	1507	1511	1513	1517	1528	1533	1548	1553	1563	1575	1611	1616	1621	1623	1627	1654	1665	1669	1674	1680	1683	1696	1698	1700	1706	1709	1717	1728
D4-2	0501	o	o	CC	o	TA	o	TA	o	CA	o	o	o	o	•	o	o	•	•	o	o	o	o	o	o	o	CC	TA	o	o	o
D4-3	0501	o	o	CC	o	TA	o	TA	o	CA	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	CC	TA	o	o	o
D4-4	0501	o	o	CC	o	TA	o	TA	o	CA	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	CC	TA	o	o	o
D4-8	0501	o	o	CC	o	TA	o	TA	o	CA	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	CC	TG	o	o	o
D5-1	0503	o	o	CC	o	TA	o	TA	o	CA	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	CC	o	o	o	o
D5-2	0503	o	o	CC	o	TA	o	TA	o	CA	o	o	o	o	o	o	o	o	•	o	o	o	o	o	o	o	CC	o	o	o	•
D5-3	0503	o	o	CC	o	TA	o	CA	o	CA	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	CC	o	o	o	o
D5-5	0503	o	o	CC	o	TA	o	TA	o	CA	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	CC	o	o	o	o
D7-4	0503	o	o	CC	o	TA	o	TA	o	CA	o	o	o	o	o	o	•	o	o	o	o	o	o	o	o	o	CC	o	o	o	o
D6-10	0602	o	o	o	CC	o	o	~~	~~	o	CC	o	o	o	o	o	o	o	o	o	•	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
D6-11	0602	o	o	o	CC	o	o	~~	~~	o	CC	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
D6-15	0602	o	o	o	CC	o	o	~~	~~	o	CC	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o

Příloha 4: Zobrazení CpG míst v regulační sekvenci genu DQB1-úsek B pro jednotlivé sekvence vzorků.

č. vzorku	DQB1 alela	1768	1772	1775	1784	1803	1811	1816	1818	1843	1846	1849	1857	1869	1876	1884	1897	1906	1915	1917	1939	1966	1969	1972	1995	2003	2072	2076	2079	2085	2092	2101	2108	2113	2136	2149	2196	2199	2200	2235	2239	2246	2248	2251	2302	2304		
D4-1	0501	o	o	o	CC	o	o	o	o	o	o	o	•	o	o	A A	C A	o	C A	o	o	C A	o	o	TA	•	o	C A	C A	•	•	o	•	•	•	C A	•	G A	•	•	•	•	•	•	•	A A		
D4-2	0501	o	o	o	CC	o	o	o	o	•	o	o	o	o	o	A A	C A	o	C A	o	o	C A	•	o	TA	o	o	C A	C A	•	•	o	•	o	•	C A	•	G A	•	•	•	o	•	•	•	A A		
D4-3	0501	T A	o	o	CC	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	A A	C A	o	C A	o	•	C A	o	o	TA	o	•	C A	C A	•	•	o	•	o	•	C A	•	G A	•	•	•	•	•	•	•	A A		
D4-4	0501	o	•	o	CC	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	A A	C A	•	C A	•	•	C A	•	o	TA	•	•	C A	C A	•	•	•	•	•	•	C A	•	G A	•	•	•	•	•	•	•	A A		
D8-1	0502	o	o	o	TC	o	o	o	o	o	o	CT	o	o	o	A A	C A	o	C A	o	•	C A	o	o	TA	•	A A	C A	C A	•	•	•	•	•	•	C A	•	G A	•	•	•	•	•	A A	•	A A		
D8-2	0502	o	o	•	TC	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	A A	C A	•	C A	o	o	C A	o	o	TA	•	A G	C A	C A	•	•	•	•	•	o	C A	o	A A	o	o	•	•	•	•	A A	•	A A	
D8-3	0502	o	o	o	TC	o	o	o	o	o	o	o	•	o	o	A A	C A	o	C A	o	o	C A	•	o	TA	•	A A	C A	C A	•	•	o	•	•	o	C A	•	G A	•	•	•	•	•	A G	•	A A		
D8-4	0502	o	o	o	TC	o	o	o	o	o	o	o	•	o	o	A A	C A	o	C A	o	o	C A	o	o	TA	•	A A	C A	C A	o	•	o	•	•	o	C A	•	G A	•	•	o	•	o	•	A A	o	A A	
D8-5	0502	o	o	o	TC	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	A A	C A	•	C A	•	o	C A	•	•	TA	o	A A	C A	C A	o	•	o	o	o	o	C A	•	G A	•	•	o	•	o	•	A A	o	A A	
D8-6	0502	o	o	o	TC	o	o	o	o	o	o	o	•	o	o	A A	C A	o	C A	o	o	C A	o	o	TA	•	A A	C A	C A	•	•	o	•	o	o	C A	T G	G A	•	o	o	•	•	A A	•	A A		
D5-2	0503	o	o	o	TC	o	o	o	o	o	•	o	o	o	o	A A	C A	o	C A	o	o	C A	o	o	TA	o	•	C A	C A	o	T G	o	•	o	o	C A	o	A A	o	o	•	•	•	•	A A	•	A A	
D7-1	0503	o	o	o	TC	o	o	o	o	o	•	•	o	o	o	A A	C A	o	C A	o	o	C A	o	o	TA	o	A A	C A	C A	•	•	o	•	•	o	C A	o	G A	•	•	o	o	•	A A	•	A A		
D7-3	0503	o	o	o	TC	o	•	o	o	o	•	•	•	o	o	A A	C A	o	C A	•	o	C A	o	o	TA	•	A A	C A	C A	•	•	•	•	•	•	C A	•	G A	•	•	•	o	•	A A	•	A A		
D7-4	0503	o	o	o	TC	•	o	o	o	o	o	o	o	o	o	A A	C A	o	C A	o	o	C A	•	o	TA	•	A A	C A	C A	o	•	•	•	•	o	•	C A	•	G A	•	o	•	•	•	A A	•	A A	
D7-5	0503	o	o	o	TC	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	A A	C A	o	C A	o	o	C A	o	o	TA	•	A A	C A	C A	o	•	•	•	•	•	C A	•	G A	•	•	•	•	•	A A	•	A A		
D3-1	0602	•	o	CT	o	o	o	o	o	o	o	o	o	A A	o	•	o	o	o	CT	CT	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	•	o	o	o	o	o	CC	o	•	C A	•	•	•	•	
D3-2	0602	o	o	CT	o	o	o	o	o	o	•	o	o	A A	o	o	o	o	o	CT	CT	•	•	•	o	•	•	•	•	o	•	o	•	o	•	•	o	o	o	CC	o	o	C A	o	o	o	o	
D3-4	0602	o	o	CT	o	o	o	o	o	o	o	o	o	A A	o	o	o	o	o	CT	CT	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	•	o	o	o	o	o	o	CC	o	•	C A	•	•	o	o
D3-5	0602	o	o	CT	o	o	o	o	o	o	o	o	o	A A	o	o	o	o	o	CT	CT	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	•	•	o	o	•	•	CC	o	•	C A	•	•	•	•	
D3-6	0602	o	o	CT	o	o	o	o	o	o	o	o	o	A A	o	o	o	o	o	CT	CT	o	•	o	o	o	o	o	o	•	•	•	o	•	o	o	o	o	o	o	CC	o	o	C A	o	o	•	o
D6-2	0602	o	o	CT	o	o	o	o	o	o	o	o	o	A A	o	o	o	o	o	CT	CT	o	o	o	o	o	o	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	CC	o	•	C A	•	•	•	•	
D6-4	0602	o	o	CT	o	o	o	o	o	•	•	o	•	A A	o	o	•	o	o	CT	CT	o	•	o	•	•	•	•	•	•	o	•	o	•	•	•	•	•	•	CC	•	•	C A	•	•	•	•	

D6-7	0602	o	o	CT	o	o	•	o	o	o	o	o	o	A A	o	CC	o	•	•	CT	CT	o	o	o	o	o	•	o	o	o	•	o	•	o	o	•	•	•	CC	o	•	C A	•	•	•	•		
D6-8	0602	o	o	CT	o	o	o	o	o	o	o	o	o	A A	o	o	o	o	o	CT	CT	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	•	o	o	o	o	o	CC	o	o	C A	o	•	o	o		
D10-3	0602	o	o	CT	o	o	o	o	o	o	o	o	o	A A	o	o	o	o	o	CT	CT	o	o	o	o	•	o	o	o	o	•	o	•	o	o	o	o	o	o	CC	o	o	C A	o	o	o	o	
D10-5	0602	o	o	CT	o	o	o	o	o	o	o	o	o	A A	o	•	o	o	o	CT	CT	o	o	o	o	o	•	•	o	•	•	o	•	•	o	o	•	o	CC	o	•	C A	•	•	•	•		
D10-6	0602	o	o	CT	o	o	o	o	o	o	•	o	o	A A	o	o	o	o	o	CT	CT	o	o	o	o	o	o	o	o	o	•	o	•	o	o	o	o	o	CC	o	•	C A	o	o	o	o		
D10-8	0602	o	o	CT	o	o	o	o	o	o	•	o	o	A A	o	o	o	o	o	CT	CT	o	o	o	o	o	o	o	o	o	•	o	•	o	o	o	o	o	CC	o	•	C A	o	o	o	o		
D2-1	0603	o	o	CT	o	o	o	o	o	o	o	o	o	G A	o	o	o	o	•	CT	CT	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	•	o	•	o	o	o	o	o	CC	o	o	C A	•	•	o	•	
D2-3	0603	o	o	CT	o	o	o	o	o	o	o	o	o	A A	o	o	o	o	o	CT	CT	•	o	o	•	•	•	•	•	•	•	•	•	o	•	•	•	•	•	•	CC	•	•	C A	•	•	•	•
D2-4	0603	o	o	CT	o	o	o	o	o	•	o	•	o	A A	o	o	o	o	o	CT	CT	•	•	•	o	•	•	•	•	•	•	•	o	•	•	•	•	•	o	CC	•	•	C A	•	•	•	•	
D2-6	0603	o	o	CT	o	o	o	o	o	o	o	o	o	A A	o	o	o	o	o	CT	CT	•	o	o	•	•	•	•	•	•	•	o	•	•	•	•	•	•	CC	•	•	C A	•	•	•	•		
D2-7	0603	o	o	CT	o	o	o	o	o	o	o	o	o	A A	o	o	o	o	•	CT	CT	o	•	o	•	•	•	•	o	o	o	o	•	•	o	o	o	o	•	CC	o	•	C A	o	o	o	o	

Příloha 5: Hodnoty p pro porovnání methylace jednotlivých CpG míst mezi generacemi. Hodnoty, které se jeví před korekcí statisticky významné jsou zobrazeny tučně, statisticky významné hodnoty po korekci jsou podbarveny šedě.

pozice	-641	-639	-596	-585	-571	-562	-540	-512	-508	-496	-476	-454	-444	-420	-374	-371	-311	-277	-271	-193
porovnávané alely																				
D1.1xS1.1	x	1,000	1,000		x	x	1,000	x	1,000	x	x	1,000	1,000	x	1,000	x	1,000	x	x	1,000
D1.1xP1.1	x	x	x	x	x	0,464	0,167	x	1,000	x	x	1,000	1,000	0,500	1,000	x	1,000	x	x	1,000
S1.1xP1.1	x	x	x	x	x	0,011	0,008	x	1,000	x	x	1,000	0,463	0,059	1,000	x	0,179	x	x	1,000
D1.2LxS1.2L	0,515	0,515	1,000	x	x	0,651	0,100	x	0,017	x	x	0,224	0,598	1,000	0,330	x	1,000	x	x	1,000
D1.2LxP1.2L	x	x	x	x	x	1,000	x	x	x	x	x	x	1,000	1,000	1,000	x	0,278	x	x	0,530
S1.2LxP1.2L	x	x	x	x	x	1,000	1,000	x	0,278	x	x	1,000	1,000	1,000	1,000	x	0,245	x	x	0,524
D1.3xS1.3	x	x	x	x	x	1,000	1,000	x	1,000	x	x	1,000	1,000	1,000	x	x	0,546	x	x	x
D1.3xP1.3	x	x	x	x	x	x	x	x	1,000	x	x	1,000	1,000	x	x	x	1,000	x	x	x
S1.3xP1.3	x	x	x	x	x	1,000	1,000	x	1,000	x	x	1,000	1,000	1,000	x	x	0,546	x	x	x
S1.4xP1.4	x	x	x	x	x	x	0,509	x	1,000	x	x	1,000	1,000	1,000	1,000	x	1,000	x	x	0,245
D2.1xS2.1	x	x	x	0,222	x	0,368	x	x	x	x	x	1,000	x	x	1,000	1,000	1,000	x	x	x
D2.1xP2.1	x	x	x	x	x	0,400	x	x	x	x	x	1,000	x	x	x	x	0,467	x	x	x
S2.1xP2.1	x	x	x	x	x	1,000	x	0,286	x	x	x	0,481	x	x	1,000	1,000	0,585	x	x	x
S3.1xP3.1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	1,000	x	x	1,000	x	1,000	x	x	x
D4.1AxS4.1A	x	x	x	1,000	x	x	x	x	1,000	x	x	x	x	0,357	x	x	x	x	0,221	x

Příloha 6: Hodnoty p pro porovnání methylace jednotlivých CpG míst mezi jednotlivými QAP alelami vzorků dětí. Hodnoty, které se jeví před korekcí statisticky významné jsou zobrazeny tučně.

pozice	-641	-639	-596	-585	-571	-562	-540	-512	-508	-496	-476	-454	-444	-420	-374	-371	-311	-277	-271	-193
porovnávané alely																				
D1.1xD1.2L	x	x	1,000	x	x	1,000	x	x	x	x	x	x	1,000	1,000	1,000	x	1,000	x	x	1,000
D1.1xD1.3	x	x	x	x	x	x	x	x	1,000	x	x	1,000	1,000	x	x	x	1,000	x	x	x
D1.1xD2.1	x	x	x	x	x	1,000	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0,429	x	x	x
D1.1xD4.1A	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	1,000	x	x	x	x	x	x
D1.2xD1.3	x	x	x	x	x	1,000	x	x	0,286	x	x	0,286	0,500	1,000	x	x	0,642	x	x	x
D1.2xD2.1	x	x	x	x	x	0,530	x	x	x	x	x	x	1,000	1,000	1,000	x	0,278	x	x	x
D1.2xD4.1A	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	1,000	1,000	x	x	x	x	x	x
D1.3xD2.1	x	x	x	x	x	0,400	x	x	x	x	x	1,000	1,000	x	x	x	0,200	x	x	x
D1.3xD4.1A	x	x	x	x	x	x	x	x	1,000	x	x	x	1,000	0,455	x	x	x	x	x	x
D2.1xD4.1A	x	x	x	0,444	x	x	x	x	x	x	x	x	x	1,000	x	x	x	x	x	x

IX

Příloha 7: Hodnoty p pro porovnání methylace jednotlivých CpG míst mezi jednotlivými QAP alelami vzorků studentů. Hodnoty, které se jeví před korekcí statisticky významné jsou zobrazeny tučně.

pozice	-641	-639	-596	-585	-571	-562	-540	-512	-508	-496	-476	-454	-444	-420	-374	-371	-311	-277	-271	-193
porovnávané alely																				
S1.1xS1.2L	x	1,000	0,365	x	x	0,081	0,304	x	0,198	x	x	1,000	0,576	0,196	0,636	x	0,722	x	x	0,671
S1.1xS1.3	x	1,000	x	x	x	0,292	0,507	x	1,000	x	x	1,000	0,507	0,292	x	x	0,340	x	x	0,530
S1.1xS1.4	x	1,000	x	x	x	0,414	0,553	x	1,000	x	x	1,000	1,000	0,414	1,000	x	0,710	x	x	0,403
S1.1xS2.1	x	0,462	x	x	x	0,485	x	x	x	x	x	1,000	1,000	x	1,000	x	0,071	x	x	x
S1.1xS3.1	x	0,136	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0,489	x	x	1,000	x	0,587	x	x	x

S1.1xS4.1A	x	1,000	x	x	x	x	x	x	0,529	x	x	x	1,000	x	x	x	x	x	x	x
S1.1xS4.2	x	x	x	x	x	x	1,000	x	x	x	x	1,000	x	0,452	x	x	0,138	x	x	1,000
S1.2LxS1.3	1,000	0,533	x	x	x	1,000	1,000	x	0,613	x	x	1,000	1,000	1,000	x	x	0,157	x	x	0,255
S1.2LxS1.4	1,000	1,000	x	x	x	0,598	1,000	x	0,170	x	x	1,000	1,000	1,000	0,598	x	1,000	x	x	1,000
S1.2LxS2.1	0,482	x	x	x	x	0,316	x	x	x	x	x	0,586	0,209	0,209	0,316	x	0,236	x	x	x
S1.2LxS3.1	x	x	x	x	x	1,000	x	x	x	x	x	1,000	x	1,000	1,000	x	1,000	x	x	x
S1.2LxS4.1A	x	x	x	x	x	x	x	x	0,116	x	x	x	0,502	0,502	x	x	x	x	x	x
S1.2LxS4.2	x	x	x	x	x	0,222	0,596	x	x	x	x	1,000	x	1,000	x	x	0,420	x	x	1,000
S1.3xS1.4	1,000	x	x	x	x	1,000	1,000	x	1,000	x	x	1,000	1,000	1,000	x	x	0,152	x	x	x
S1.3xS2.1	0,333	x	x	x	x	0,526	x	x	x	x	x	0,526	0,304	0,304	x	x	0,011	x	x	x
S1.3xS3.1	x	x	x	x	x	1,000	x	x	x	x	x	1,000	x	1,000	x	x	0,191	x	x	x
S1.3xS4.1A	x	x	x	x	x	x	x	x	0,438	x	x	x	0,438	0,438	x	x	x	x	x	x
S1.3xS4.2	x	x	x	x	x	0,333	1,000	x	x	x	x	1,000	x	1,000	x	x	0,018	x	x	x
S1.4xS2.1	0,333	x	x	x	x	1,000	x	x	x	x	x	1,000	0,429	0,429	1,000	x	0,231	x	x	x
S1.4xS3.1	x	x	x	x	x	1,000	x	x	x	x	x	0,450	x	1,000	1,000	x	1,000	x	x	x
S1.4xS4.1A	x	x	x	0,391	x	x	x	x	1,000	x	x	x	1,000	1,000	x	x	x	x	x	x
S1.4xS4.2	x	x	x	x	x	0,462	0,580	x	x	x	x	1,000	x	1,000	x	x	0,401	x	x	0,673
S2.1xS3.1	x	x	x	x	x	1,000	x	x	x	x	x	0,368	x	x	1,000	1,000	1,000	x	x	x
S2.1xS4.1A	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
S2.1xS4.2	x	x	x	x	x	1,000	x	x	x	x	x	1,000	x	0,467	x	x	1,000	x	x	x
S3.1xS4.1A	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
S3.1xS4.2	x	x	x	x	x	x	x	x	x	1,000	x	0,405	x	1,000	x	x	1,000	x	x	x
S4.1AxS4.2	x	x	x	1,000	1,000	x	x	x	x	1,000	x	x	x	1,000	x	x	x	x	x	x

Příloha 8: Hodnoty p pro porovnání methylace jednotlivých CpG míst mezi jednotlivými QAP alelami vzorků seniorů. Hodnoty, které se jeví před korekcí statisticky významné jsou zobrazeny tučně.

pozice	-641	-639	-596	-585	-571	-562	-540	-512	-508	-496	-476	-454	-444	-420	-374	-371	-311	-277	-271	-193
porovnávané alely																				
P1.1xP1.2L	x	x	x	x	x	0,200	x	x	1,000	x	x	1,000	1,000	0,467	1,000	x	1,000	x	x	x
P1.1xP1.3	x	x	x	x	x	0,182	x	x	1,000	x	x	1,000	1,000	0,455	x	x	0,242	x	x	x
P1.1xP1.4	x	x	x	x	x	0,070	x	x	0,462	x	x	0,462	0,462	0,192	0,462	x	0,559	x	x	x
P1.1xP2.1	x	x	x	x	x	0,182	x	x	x	x	x	1,000	1,000	0,455	1,000	x	1,000	x	x	x
P1.1xP3.1	x	x	x	x	x	0,200	x	x	x	x	x	1,000	x	0,467	1,000	x	0,500	x	x	x
P1.2LxP1.3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0,167	x	x	x
P1.2LxP1.4	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0,236	x	x	x
P1.2LxP2.1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	1,000	x	x	x	x	0,467	x	x	x
P1.2LxP3.1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	1,000	x	0,429	x	x	x
P1.3xP1.4	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	1,000	x	x	x
P1.3xP2.1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	1,000	x	x	x	x	0,567	x	x	x
P1.3xP3.1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	1,000	x	x	x
P1.4xP2.1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0,462	x	x	x	x	1,000	x	x	x
P1.4xP3.1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0,364	x	1,000	x	x	x
P2.1xP3.1	x	x	x	x	x	x	x	1,000	x	x	x	1,000	x	x	0,400	x	1,000	x	x	x

Příloha 9: Hodnoty p pro porovnání methylace jednotlivých CpG míst mezi jednotlivými DQB1 alelami v oblasti intronu 2 ve vzorku dětské populace. Hodnoty, které se jeví před korekcí statisticky významné jsou zobrazeny tučně, statisticky významné hodnoty po korekci jsou podbarveny šedě.

pozice																			
porovnávané alely	1843	1846	1849	1857	1869	1876	1884	1897	1906	1915	1917	1939	1966	1969	1972	1995	2003	2072	2076
0501x0502	0,400	x	x	0,571	x	x	x	x	1,000	x	1,000	0,500	x	1,000	1,000	x	0,500	x	x
0501x0503	0,444	0,167	0,444	1,000	x	x	x	x	0,444	x	1,000	0,167	x	0,524	x	x	1,000	x	x
0501x0602	0,405	0,524	x	0,222	x	x	x	x	0,405	x	x	x	x	0,533	1,000	x	0,533	1,000	x
0501x0603	1,000	x	x	0,444	x	x	x	x	0,444	x	x	x	x	1,000	1,000	x	0,524	0,524	x
0502x0503	x	0,061	0,444	0,546	x	x	x	x	0,455	x	1,000	1,000	x	1,000	1,000	x	0,546	x	x
0502x0602	1,000	0,268	x	0,018	x	x	x	x	0,202	x	x	x	x	0,613	0,521	x	0,018	x	x
0502x0603	0,455	x	x	0,182	x	x	x	x	0,455	x	x	x	x	1,000	1,000	x	1,000	x	x
0503x0602	1,000	0,305	0,059	0,263	x	x	x	x	1,000	x	x	x	x	1,000	1,000	x	0,262	x	x
0503x0603	1,000	0,167	1,000	1,000	x	x	x	x	x	x	x	x	x	1,000	1,000	x	1,000	x	x
0602x0603	0,468	0,530	x	x	x	x	1,000	1,000	1,000	0,155	x	x	0,037	0,570	0,468	0,037	0,038	0,141	0,603

pozice																		
porovnávané alely	2079	2085	2092	2101	2108	2113	2136	2149	2196	2199	2200	2235	2239	2246	2248	2251	2302	2304
0501x0502	x	0,467		1,000	1,000	1,000	0,048	x	1,000	x	1,000	0,076	1,000	1,000	1,000	x	0,467	x
0501x0503	x	0,167		0,524	x	1,000	0,444	x	0,444	x	1,000	0,444	1,000	1,000	1,000	x		x
0501x0602	x	0,023	0,524	1,000	x	1,000	0,011	x	0,082	x	x	0,002	0,524	x	0,119	0,245	0,119	x
0501x0603	x	0,444	1,000	1,000	x	1,000	0,444	x	0,444	x	x	0,444	1,000	x	1,000	1,000	0,444	x
0502x0503	x	0,567		0,567	1,000	1,000	0,242	x	1,000	x	1,000	0,567	1,000	1,000	1,000	x	0,455	x
0502x0602	x	0,161	0,268	0,549	0,300	0,336	1,000	x	0,141	x	x	0,202	1,000	x	0,052	x	0,642	x
0502x0603	x	1,000	0,455	1,000	1,000	1,000	1,000	x	1,000	x	x	0,567	1,000	x	0,455	x	1,000	x
0503x0602	x	1,000	0,524	0,084	x	0,603	0,262	x	0,603	x	x	0,037	1,000	x	0,106	1,000	0,106	x
0503x0603	x	1,000	1,000	0,524	x	1,000	1,000	x	1,000	x	x	1,000	1,000	x	1,000	1,000	0,444	x
0602x0603	0,305	0,305	1,000	1,000	x	0,603	0,262	0,305	0,603	0,305	x	0,037	1,000	x	0,338	0,603	1,000	0,303